

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
13 February 2003 (13.02.2003)

PCT

(10) International Publication Number  
**WO 03/011342 A2**

- (51) International Patent Classification<sup>7</sup>: **A61K 47/48**, 51/10, 51/04
- (21) International Application Number: PCT/GB02/03494
- (22) International Filing Date: 31 July 2002 (31.07.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/308,605 31 July 2001 (31.07.2001) US
- (71) Applicant: **IMMUNOMEDICS, INC.** [US/US]; 300 American Road, Morris Plains, NJ 07950 (US).
- (71) Applicant (for BB, MG only): **MCCALL, John, Douglas** [GB/GB]; 25 Haddon Drive, Pensby, Wirral CH61 8TF (GB).
- (72) Inventor: **GRIFFITHS, Gary, L.**; 36 Edgehill Avenue, Morristown, NJ 07960 (US).
- (74) Agent: **W.P. THOMPSON & CO.**; Coopers Building, Church Street, Liverpool L1 3AB (GB).
- (81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:**  
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*



**WO 03/011342 A2**

(54) Title: POLYMERIC DELIVERY SYSTEMS

(57) Abstract: The present invention relates to a method of targeting an agent towards a targeting site in a tissue comprising administering a multi-specific antibody or antibody fragment comprising a targeting arm and a capture arm that binds to a polymer conjugate, and administering a polymer conjugate to the tissue. The present invention also relates to a kit for targeting a target site within a comprising a multi-specific antibody or antibody fragment comprising a targeting arm and a capture arm that binds to a polymer conjugate, and a polymer conjugate.

(19) 日本国特許庁 (JP)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-501052

(P2005-501052A)

(43) 公表日 平成17年1月13日 (2005.1.13)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 47/48	A 6 1 K 47/48	4 C 0 7 6
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	4 C 0 8 5
A 6 1 K 49/00	A 6 1 K 39/395	L
A 6 1 K 51/00	A 6 1 K 49/00	C
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 96 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-516572 (P2003-516572)	(71) 出願人	599176263
(86) (22) 出願日	平成14年7月31日 (2002.7.31)		イムノメディクス, インコーポレイテッ ド
(85) 翻訳文提出日	平成16年2月2日 (2004.2.2)		アメリカ合衆国、07950 ニュー・ジ ャージー、モリス・ブレインズ、アメリカ ン・ロード 300
(86) 国際出願番号	PCT/GB2002/003494		
(87) 国際公開番号	W02003/011342	(74) 代理人	100099623
(87) 国際公開日	平成15年2月13日 (2003.2.13)		弁理士 奥山 尚一
(31) 優先権主張番号	60/308,605	(74) 代理人	100096769
(32) 優先日	平成13年7月31日 (2001.7.31)		弁理士 有原 幸一
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100107319
			弁理士 松島 鉄男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ポリマー送達系

## (57) 【要約】

本発明は、組織中の標的部位に薬剤をターゲティングする方法であって、ポリマー複合物に結合するターゲティングアームおよび捕捉アームを含む多特異性抗体または抗体フラグメントを投与するステップと、組織にポリマー複合物を投与するステップとを含む方法に関する。本発明はまた、標的部位のターゲティング用キットであって、ポリマー複合物に結合するターゲティングアームとおよび捕捉アームを含む多特異性抗体または抗体フラグメントと、ポリマー複合物とを含むキットを提供する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

組織中の標的部位への薬剤のターゲティング方法であって、

(a) 該標的部位上の抗原に結合するターゲティングアームとポリマー複合物に結合する捕捉アームとを含む、多特異性抗体または抗体フラグメントを、該組織に投与するステップと、

(b) 該捕捉アームに結合するポリマー複合物であって、治療薬、ペプチド、酵素、および標識リガンドからなる群から選択される該薬剤に複合化したポリマーを含むポリマー複合物を、該組織に投与するステップと

を含む方法。

10

## 【請求項 2】

前記ポリマー複合物が、(ポリマー骨格)<sub>m</sub>-(薬剤)<sub>n</sub> (式中、mは整数である)を含む一般式を有する請求項 1 の方法。

## 【請求項 3】

前記ポリマー複合物が、前記ポリマーに複合化した認識ハプテンをさらに含む請求項 1 の方法。

## 【請求項 4】

前記ポリマー複合物が、(認識ハプテン)<sub>n</sub>-(ポリマー骨格)<sub>m</sub>-(薬剤)<sub>n</sub> (式中、nおよびmは整数である)を含む一般式を有する請求項 3 の方法。

20

## 【請求項 5】

前記認識ハプテンが、ジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)、DTPAの金属複合体、1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-N, N', N'', N'''-四酢酸(DOTA)、DOTAの金属複合体、N, N'-ジ[2-ヒドロキシー-5-(エチレン-3-カルボキシ)ベンジル]エチレンジアミンN, N'-二酢酸(HBED)、HBEDの金属複合体、フルオレセイン、2, 4-ジニトロフェニル誘導体、ビオチン、およびヒスタミルスクシニル-グリシンからなる群から選択される請求項 3 の方法。

## 【請求項 6】

前記多特異性抗体または抗体フラグメントが放射性標識されている請求項 1 の方法。

## 【請求項 7】

前記組織に除去組成物を投与するステップと、前記除去組成物により前記組織から非結合多特異性抗体または抗体フラグメントを除去するステップとをさらに含む請求項 1~7 のいずれかに記載の方法。

30

## 【請求項 8】

前記多特異性抗体または抗体フラグメントがモノクローナル抗体である請求項 1~7 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 9】

前記多特異性抗体または抗体フラグメントが、キメラ抗体、ヒト化抗体、またはヒト抗体である請求項 1~7 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 10】

前記ポリマーが、単一のアミノ酸のポリマー、2種のアミノ酸のコポリマー、3種のアミノ酸のコポリマー、4種のアミノ酸のコポリマー、ポリエチレングリコール(PEG)、PEGの誘導体、PEGのコポリマー、N-(2-ヒドロキシプロピル)メタクリルアミド(HPMA)、ポリスチレン-無水マレイン酸コポリマー(SMA)、ポリビニルエーテル無水マレイン酸(DIVEMA)、ポリエチレンイミン、エトキシ化ポリエチレンイミン、スターバーストデンドリマー、ポリビニルピロリドン(PVP)、アポメタロチオネイン、およびカリケアミシンからなる群から選択される請求項 1 の方法。

40

## 【請求項 11】

前記治療薬が、治療用放射性同位体、毒素、薬物、プロドラッグ、およびホウ素追加物からなる群から選択される請求項 1 の方法。

## 【請求項 12】

50

前記標識リガンドが、放射性同位体、核磁気共鳴造影法で使用するための増強剤、造影剤、および着色剤からなる群から選択される請求項1の方法。

【請求項13】

被験体の組織または組織サンプル内の標的部位のターゲティングに有用なキットであって、

(a) 該組織内の抗原に結合するターゲティングアームとポリマー複合物に結合する捕捉アームとを含む多特異性抗体または抗体フラグメントと、

(b) 該捕捉アームに結合するポリマー複合物であって、治療薬、ペプチド、酵素、および標識リガンドからなる群から選択される該薬剤に結合したポリマーを含むポリマー複合物と

10

を含むキット。

【請求項14】

前記ポリマー複合物が、認識ハプテンをさらに含む請求項13のキット。

【請求項15】

薬物またはプロドラッグをさらに含む請求項13のキット。

【請求項16】

前記酵素が、前記プロドラッグを活性な薬物に変換する請求項15のキット。

【請求項17】

前記被験体または組織サンプルから非結合多特異性抗体または抗体フラグメントを除去することができる除去剤をさらに含む請求項13～16のいずれかに記載のキット。

20

【請求項18】

前記多特異性抗体または抗体フラグメントが、モノクローナル抗体である請求項17に記載のキット。

【請求項19】

前記多特異性抗体または抗体フラグメントが、キメラ抗体、ヒト化抗体、またはヒト抗体である請求項17に記載のキット。

【請求項20】

前記多特異性抗体または抗体フラグメントが、放射性標識されている請求項17に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】

【0001】

〔発明の分野〕

本発明は、組織中の標的部位に薬剤をターゲティングする方法であって、ポリマー複合物(polymer conjugate)に結合するターゲティングアームおよび捕捉アーム(capture arm)を含む多特異性抗体または抗体フラグメント(multi-specific antibody or antibody fragment)を投与するステップと、組織にポリマー複合物を投与するステップとを含む方法に関する。本発明はまた、組織内の標的部位のターゲティング用キットであって、ポリマー複合物に結合するターゲティングアームおよび捕捉アームを含む多特異性抗体または抗体フラグメントと、ポリマー複合物とを含むキットに関する。

40

【背景技術】

【0002】

〔関連技術〕

治療結果の改良を追求する抗癌治療における現在のアプローチの1つは、長期循環ポリマーへの薬物の結合である。長期循環ポリマーは、薬物、プロドラッグ、または治療薬の血中での半減期を延長し、一般に、薬剤が腫瘍部位に到達する割合が増加する。さらに、腫瘍の微小環境でポリマーを含む高分子を優先的に融合させて、より多数の治療薬を標的部位に到達させることができる。

【0003】

しかし、半減期の増加につれてポリマーに結合した薬物由来の毒性が増加し、化学療法に

50

悪影響を与え得る副作用が増大し得る。さらに、長期循環ポリマー自体が患者由来の免疫応答を誘発し、ポリマーおよびこれに結合した薬物が天然に存在する抗体に拘束されて無効になり得る。

【発明の開示】

【0004】

ポリマー-薬物複合物治療に関するこれらのおよび他の問題を克服するために、本発明は、腫瘍部位に局在し、保持されることができ、薬物-ポリマー複合物量をさらに増大させる方法に関する。本方法は、癌に指向する一方のアームと、ハプテンに指向する他方のアームとを有する、多特異性抗体などの多特異性ターゲティング薬の予備注射に依存する。典型的には、本発明で有用な薬剤は、(認識ハプテン)<sub>n</sub>-(ポリマー骨格)-(薬剤またはプロドラッグ療法部分)<sub>m</sub>またはポリマー骨格-(薬物またはプロドラッグ療法部分)<sub>m</sub>。(式中、nおよびmは各ポリマー骨格における異なる置換レベルを反映する整数である)を含む一般式を有する。多特異性抗体で癌を予備ターゲティングした後にポリマー-薬物複合物を使用する。前者の場合、一方のアームはハプテンを認識する。後者の場合、二重特異性抗体の一方のアームは、ポリマー骨格の一部もしくは全部、または、付加された薬物の一部もしくは全部に指向する。

10

【0005】

本明細書中に開示の方法を、治療または診断目的で使用する事ができる。さらに、以下の説明から明らかなように、多特異性抗体がポリマー複合物を認識する系は、多様な用途で非常に多目的に使用することができる。

20

【0006】

【発明の要約】

本発明は、組織中の標的部位への薬剤のターゲティング方法であって、

(a) 該標的部位上の抗原に結合するターゲティングアームとポリマー複合物に結合する捕捉アームとを含む、多特異性抗体 (msAb: multi-specific antibody) または多特異的抗体フラグメントを、該組織に投与するステップと、

(b) 該捕捉アームに結合するポリマー複合物であって、治療薬、ペプチド、酵素、および標識リガンドからなる群から選択される該薬剤に複合化したポリマーを含むポリマー複合物を組織に投与するステップと

を含む方法に関する。

30

【0007】

本発明はまた、組織または組織サンプル内の標的部位のターゲティングに有用なキットであって、

(a) 該標的部位上の抗原に結合するターゲティングアームと、ポリマー複合物またはハプテン-ポリマー複合物に結合する捕捉アームとを含む多特異性抗体または抗体フラグメントと、

(b) 該捕捉アームに結合するポリマー複合物であって、治療薬、ペプチド、酵素、および標識リガンドからなる群から選択される薬剤に複合化したポリマーを含むポリマー複合物と

を含むキットに関する。

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

本発明は、組織中の標的部位への薬剤のターゲティング方法であって、(a) 該標的部位上の抗原に結合するターゲティングアームとポリマー複合物に結合する捕捉アームとを含む、多特異性抗体 (msAb) または多特異的抗体フラグメントを組織に投与するステップと、(b) 該捕捉アームに結合するポリマー複合物であって、治療薬、ペプチド、酵素、および標識リガンドからなる群から選択される前記薬剤に複合化したポリマーを含むポリマー複合物を組織に投与するステップとを含む方法に関する。好ましくは、本発明のポリマー複合物は、一般式 (ポリマー-骨格)-(薬剤)<sub>m</sub>。(式中、mは0を含む整数である) を有する。

50

## 【0009】

本明細書中で使用される、用語「組織」は、当業者が理解している組織を意味するために使用される。本発明で想定する場合、組織はまた、個別の細胞、細胞培養物、体内組織または体液（例えば、血球）またはこれらの群を意味するために使用される。さらに、組織は被験体内に存在するか、生検するか、または被験体から取り出すことができる。組織はまた、体内器官の全体または任意の一部であり得る。さらに、切除と本発明の方法との間にいかなる保存工程を行うことなく被験体から組織をすぐに取り出しているという点で、組織は「新鮮」であり得る。組織はまた、本発明の方法の適用前に標準的な組織調製技術（凍結、急速凍結、パラフィン包埋、および組織固定が含まれるが、これらに限定されない）によって保存されることもできる。

10

## 【0010】

本明細書中で使用される、用語「患者または被験体」は交換可能に使用され、これは、任意の動物、好ましくはヒトおよび非ヒト霊長類を含む哺乳動物を意味するために使用される。

## 【0011】

本明細書中で使用される、用語「標的」は、薬剤または化合物の任意のタイプに指向し得る組織の位置(locus)の部位を意味するために使用する。位置は、正常部分および／または疾患部分を含む組織の任意の部分または細胞自体を意味するために使用することができる。位置はまた、罹患組織の病因または症状を含み得る組織周辺の領域を意味し得る。標的部位は、組織全体であってもよく、腫瘍内の血管などの組織の一部であってもよく、または、インビボもしくはインビトロまたはインサイチューで、組織を構成する個々の細胞または細胞群であってもよい。これはまた、標的組織の位置で融合する分子または分子サブユニットであり得る。さらに、標的部位は、罹患組織の近傍の病原体に関連し得るので、このため、標的部位は必ずしも細胞または組織に直接接触しているまたは組み込まれている必要はない。「標的部位」および「標的組織」は、本明細書中では交換可能に使用される。

20

## 【0012】

本発明は、ポリマー複合物を組織内の標的部位に指向させるために多特異性抗体(m s A b)を使用する。本明細書中で使用される、「多特異性抗体」は、本発明のm s A bが1つを超える抗原またはエピトープに結合または認識するように1つを超える特異性または1つを超える結合価を有する。例えば、本発明の二重特異性抗体には、免疫グロブリンの各アームが個別のエピトープまたはハプテンを認識または結合する抗体が含まれる。本発明の多特異性抗体はまた、二重特異性よりも高い特異性(三重特異性または四重特異性抗体などが含まれるが、これらに限定されない)を含む。例えば、三重特異性抗体は、2つのアームが2つの異なる細胞抗原に指向し、および第3のアームがハプテンまたは薬物に指向する抗体を含み得る。本明細書中で使用される、「多特異性抗体」には、1つを超える結合価を有する抗体も含まれる。例えば、本発明に含まれる抗体は、抗体が二重特異性、さらに3価であるように1つの細胞エピトープに指向する2つのアームおよびハプテンまたは薬物に指向する第3のアームから構成され得る。さらに、標的アームまたはm s A bのアームは、標的組織上の2つまたはそれ以上の各エピトープに指向することができ、および捕捉アーム(単数または複数)は、ポリマー複合物上の2つまたはそれ以上の各ハプテンに指向し得る。

30

40

## 【0013】

本発明に含まれるように、m s A bは、抗体多特異性抗体フラグメントを含む。抗体フラグメントは、 $F(a b')_2$ 、 $F(a b)_2$ 、 $F a b'$ 、および $F a b$ などの抗体の抗原結合部分である。抗体フラグメントは、インタクトな抗体によって認識されるものと同一の抗原に結合する。例えば、抗CD22モノクローナル抗体フラグメントは、CD22のエピトープに結合する。本発明のm s A bには、 $I g G \times I g G$ 、 $I g G \times F(a b')_2$ 、 $I g G \times F a b'$ 、 $I g G \times s c F v$ 、 $F(a b')_2 \times F(a b')_2$ 、 $F a b' \times F(a b')_2$ 、 $F a b' \times F a b'$ 、 $F a b' \times s c F v$ 、および $s c F v \times s c F v$ 二

50

重特異性モノクローナル抗体 (b i s m A b : bi-specific monoclonal antibody) が含まれるが、これらに限定されない。s c F v × I g G × s c F v および F a b' × I g G × F a b'、s c F v × F (a b')<sub>2</sub> × s c F v および F a b' × F (a b')<sub>2</sub> × F a b' などの化合物も含まれる。最も好ましくは、一方または両方のモノクローナル抗体 (m A b) の I g G または F (a b')<sub>2</sub> 上の部位特異的結合部位 (改変炭水化物または改変もしくは遊離した遊離チオール基など) を使用することができる。これらの m A b は二量体であるので、これらを第 2 の m A b の 2 つの分子とカップリングさせることができる。例えば、改変軽鎖炭水化物を有する癌胎児抗原 (C E A : carcinoembryonic antigen) に指向する m A b (抗 C E A F (a b')<sub>2</sub>) を酸化し、ヒドラジドマレイミド架橋剤を使用して、各軽鎖あたり少なくとも 1 つの懸垂マレイミド基を有する誘導体化抗 C E A F (a b')<sub>2</sub> に変換することができる。少なくとも抗キレート F a b' × 抗 C E A - F (a b')<sub>2</sub> - 抗キレート F a b' 複合物が生成されるように、この化合物を 1 : 2 のモル比で抗キレート F a b' - S H とカップリングさせる。得られた m s A b は、標的組織およびポリマー複合物に関して 2 価である。本開示中の用語「m s A b」は多特異性抗体および多特異性抗体フラグメントを含むとさらに理解される。

#### 【0014】

用語「抗体フラグメント」には、特異的抗原への結合によって複合体が形成される抗体と同様に作用する任意の合成または遺伝子操作タンパク質も含まれる。例えば、抗体フラグメントには、重鎖および軽鎖の可変領域からなる単離フラグメント (「F v」フラグメント)、軽鎖および重鎖の可変領域がペプチドリンカーで接続された組換え一本鎖ポリペプチド分子 (「s F v タンパク質」)、および超可変領域を模倣するアミノ酸残基または関連ペプチドからなる最小認識単位が含まれる。

#### 【0015】

本発明の m s A b は、本来モノクローナルまたはポリクローナルであるが、モノクローナル抗体が好ましい。さらに、m s A b のターゲティングアームおよび捕捉アームは、本来モノクローナルまたはポリクローナルであり得る。好ましくは、標的アームまたは捕捉アームのいずれかはモノクローナルである。最も好ましくは、標的アームおよび捕捉アームは共にモノクローナルである。

#### 【0016】

本発明の m s A b を、標識を保有するように操作することができる。m s A b が保有することができる標識の例には、ビオチン-ストレプトアビジン複合体および放射性同位体などの標識リガンドが含まれるが、これらに限定されない。有利には、局在化およびクリアランスの追跡を容易にするために本発明の m s A b を放射性標識する。

#### 【0017】

m s A b のターゲティングアームおよび捕捉アームの片方または両方は、キメラ抗体、ヒト抗体、またはヒト化抗体であり得る。

#### 【0018】

本明細書中で使用される、「ターゲティングアーム」は、標的組織の位置に存在する抗原を認識および/または結合する m s A b の一部を意味するために使用される。抗原は、細胞もしくは組織または細胞表面膜の一部に外部から付着していてもよく、グリコシルホスファチジルイノシトール (G P I) 固定タンパク質であってもよく、細胞内部に存在してもよい。さらに、抗原を、流動物 (全血、リンパ液、または脳脊髄液の任意の一部が含まれるが、これらに限定されない) に関連させることができる。さらに、抗原は、正常な、異常な、罹患した、または壊死した細胞または組織中に存在してもよく、これらによって融合されてもよく、または、これらによって分泌または放出されてもよい。さらに、抗原は、病原体 (標的組織の位置に存在するウイルス、細菌および/またはプリオンが含まれるが、これらに限定されない) 上に存在してもよい。したがって、抗原は必ずしも細胞に直接接触している必要も組み込まれている必要もない。抗原は、特定の特徴 (識別可能な細胞表面関連抗原など) を有してもよく、1 つを超える組織または細胞型によって共有される一般的な特徴を有してもよい。例えば、β 1 インテグリンは、抗原性を示す種々の

10

20

30

40

50

正常または罹患組織によって共有される細胞外細胞接着分子であり、本発明において標的部位の位置における抗原と考えられる。抗原の例には、MHC複合体成分、受容体、および腫瘍抗原が含まれるが、これらに限定されない。特に、このような抗原には、癌胎児抗原(CEA)、17-1A、結腸特異的抗原P、上皮糖タンパク質、HER-2/neu、上皮増殖因子受容体、CD19、CD20、CD22、およびCD74が含まれる。

#### 【0019】

本明細書中で使用される、「捕捉アーム」は、ポリマー複合物を認識して結合するmsAbの一部を意味するために使用される。捕捉アームは、ポリマー複合物のポリマー骨格を直接、または、ポリマー骨格に複合化した薬剤を、または、ポリマー-薬物複合物に結合したハプテンを認識してもよい。

10

#### 【0020】

例えば、ペプチドから構成されるポリマー骨格に対する抗体を、周知のAb産生方法によって作製する。例えば、(ペプチド)<sub>n</sub>-KLH(n=1~30)などの免疫原を含むフロイント完全アジュバントの注射後に、フロイント不完全アジュバント中に懸濁した同一の免疫原を免疫応答性動物に2回注射し、抗原のi.v.促進の3日後に脾臓細胞を採取する。次いで、採取した脾臓細胞を、Sp2/O-Ag14骨髓腫細胞と融合し、得られたクローンの培養上清を、直接結合ELISAを使用して抗ペプチド反応性について分析した。作製したAbの正確な特異性を、元の免疫原のペプチドフラグメントの使用によって分析することができる。これらのフラグメントを、自動化ペプチド合成機を使用して容易に調製することができる。Ab産生について、融合細胞株を選択することができるように酵素欠損ハイブリドーマを単離する。この技術を使用して、ポリマー複合物を含む1つまたは複数のキレート(例えば、In(III)-DTPAキレート)に対する抗体を惹起することもできる。In(III)-ジ-EDTAに対するマウスモノクローナル抗体は、当分野で公知である(例えば、米国特許第5,256,395号)。

20

#### 【0021】

免疫原に対する抗体の最初の惹起後、抗体を配列決定し、その後組換え技術によって調製することができる。マウス抗体および抗体フラグメントのヒト化およびキメラ化は、当業者に周知である。例えば、マウス免疫グロブリンの重鎖および軽鎖の可変鎖由来のマウス相補性決定領域をヒト可変ドメインに導入し、その後マウス対照物のフレームワーク領域中のヒト残基と置換することによって、ヒト化モノクローナル抗体を産生する。ヒト化モノクローナル抗体由来の抗体成分の使用により、マウス定常領域の免疫原性に関連する潜在的な問題が回避される。マウス免疫グロブリン可変ドメインの一般的なクローニング技術は、例えば、Orlandiら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA、86、3833、1989の文献(その全体が本明細書中で参照して参照して組み込まれる)に記載されている。ヒト化mAbの産生技術は、例えば、Jonesら、Nature、321、522、1986、Riechmannら、Nature、332、323、1988、Verhoevenら、Science、239、1534、1988、Carterら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA、89、4285、1992、Sandhu、Crit.Rev.Biotech.、12、437、1992、およびSingerら、J.Immun.、150、2844、1993(それぞれ本明細書中で参照して組み込まれる)に記載されている。

30

#### 【0022】

あるいは、トランスジェニック非ヒト動物から完全なヒト抗体を得ることができる。例えば、Mendezら、Nature Genetics、15、146-156、1997;米国特許第5,633,425号を参照のこと。例えば、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を有するトランスジェニックマウスからヒト抗体を回収することができる。マウス体液性免疫系を、内因性免疫グロブリン遺伝子の不活化およびヒト免疫グロブリン遺伝子座への導入によってヒト化する。ヒト免疫グロブリン遺伝子座は非常に複雑であり、ほぼ0.2%のヒトゲノムを共に占める多数の個別のセグメントを含む。トランスジェニックマウスが適切な抗体レパートリーを産生することができることを確認するために、ヒト重鎖および軽鎖の遺伝子座の大部分をマウスゲノムに導入しなければならない。生殖細胞系列の配置でヒト重鎖または軽鎖免疫グロブリン遺伝子座のいずれかを含む酵母人工染色体(YAC)の形成から開始される段階的プロセスでこれを行う。各インサートが約1Mbのサイズであるので、YAC構築には免疫グロブリン

40

50



遺伝子座の重複フラグメントの相同組換えが必要である。一方が重鎖遺伝子座を含み、他方が軽鎖遺伝子座を含む2つのYACを、マウス胚幹細胞へのYAC含有酵母スフェロプラストの融合を介して個別にマウスに導入する。次いで、胚幹細胞クローンを、マウス胚盤胞に微量注入する。得られたキメラ雄を、その生殖系列細胞によるYACの輸送能力についてスクリーニングし、マウス抗体産生欠損マウスと交配する。2つのトランスジェニック系統（一方はヒト重鎖遺伝子座を含み、他方はヒト軽鎖遺伝子座を含む）の交配により、免疫化に応答してヒト抗体を産生する子孫が作製される。

#### 【0023】

非再整列ヒト免疫グロブリン遺伝子を、微小核体媒介染色体導入(MMCT: microcell-mediated chromosome transfer)を介してマウス胚幹細胞に移入することもできる。例えば、Tomizukaら、Nature Genetics、16、133、1997を参照のこと。この方法では、ヒト染色体を含む微小核体をマウス胚幹細胞と融合する。導入された染色体は安定に保持され、成体キメラは適切な組織特異的発現を示す。

#### 【0024】

別の方法として、本発明の抗体または抗体フラグメントは、組み合わせ免疫グロブリンライブラリーから単離したヒト抗体フラグメントに由来し得る。例えば、Barbasら、METHODS: A Companion to Methods in Enzymology、2、119、1991およびWinterら、Ann. Rev. Immunol.、12、433、1994（本明細書中で参照して組み込まれる）を参照のこと。B細胞不死化によるモノクローナル抗体産生に関する多数の困難を、ファージディスプレイを使用した大腸菌での抗体フラグメントの操作および発現によって克服することができる。高親和性モノクローナル抗体の回復を確実にするために、組み合わせ免疫グロブリンライブラリーは、巨大なレパートリーサイズを含まなければならない。典型的なストラテジーは、免疫化マウスのリンパ球または脾臓細胞から得たmRNAを使用し、逆転写酵素を使用してcDNAを合成する。重鎖および軽鎖の遺伝子を、個別にPCRで増幅し、ファージクローニングベクターにライゲーションする。一方が重鎖遺伝子を含み、他方が軽鎖遺伝子を含む2つの異なるライブラリーが産生される。ファージDNAを各ライブラリーから単離し、重鎖および軽鎖配列を共にライゲーションおよび封入して組み合わせライブラリーを形成する。各ファージは、重鎖および軽鎖のcDNAのランダムな対を含み、大腸菌の感染時に感染細胞中の抗体鎖の発現を指示する。目的の抗原を認識する抗体を同定するために、ファージライブラリーをプレートし、プラーク中に存在する抗体分子をフィルターに移す。フィルターを放射性標識抗原と共にインキュベートし、洗浄して過剰な非結合リガンドを除去する。オートラジオグラム上の放射性スポットにより、抗原に結合した抗体を含むプラークを同定する。ヒト免疫グロブリンファージライブラリーの産生に有用なクローニングベクターおよび発現ベクターを、例えば、STRATAGENEクローニングシステム(La Jolla, CA)から得ることができる。

#### 【0025】

類似のストラテジーを使用して、高親和性scFvを得ることができる。例えば、Vaughnら、Nat. Biotechnol.、14、309-314、1996を参照のこと。巨大なレパートリーを有するscFvライブラリーを、全ての公知のV重鎖( $V_H$ )およびV軽鎖( $V_K$ および $V_L$ )遺伝子ファミリーに対応するPCRプライマーを使用した非免疫化ヒトドナーからのV遺伝子の単離によって構築することができる。増幅後、 $V_K$ および $V_L$ プールを合わせて1つのプールにする。これらのフラグメントを、ファージミドベクターにライゲーションする。 $scFv$ リンカー( $Gly_4-Ser_1$ )<sub>3</sub>を、V軽鎖( $V_L$ )フラグメントのファージミド上流にライゲーションする。 $V_H$ およびリンカー- $V_L$ フラグメントを増幅し、 $J_H$ 領域上に構築する。得られた $V_H$ -リンカー- $V_L$ フラグメントを、ファージミドベクターにライゲーションする。ファージミドライブラリーを、上記のフィルターまたは免疫チューブ(Nunc、Maxisorp)を使用して選択することができる。免疫化ウサギのリンパ球または脾臓細胞由来の免疫グロブリンの組み合わせライブラリーの構築およびP.pastorisでのscFv構築物の発現によって類似の結果を得ることができる。例えば、Ridderら、Biotechnology、13、255-260、1995を参照のこと。さらに、適切なscFvの単離後、より高い結合親

和性およびより遅い解離速度を有する抗体フラグメントを、CDR3変異誘発および鎖のシャプリングなどの親和性変異プロセスによって得ることができる。例えば、Jacksonら、Br.J.Cancer、78、181-188、1998、Osbornら、Immunotechnology、2、181-196、1996を参照のこと。

#### 【0026】

当分野で公知の技術（例えば、抗CEA腫瘍Abおよび抗ペプチドAbをそれぞれ共にペプシン消化してその各F(ab')<sub>2</sub>を得る）によってmsAbを調製することができる。抗CEA-Ab-F(ab')<sub>2</sub>をシステインで還元してFab'単量体単位を作製し、ビス(マレイミド)ヘキサンのような架橋剤とさらに反応させてFab'-マレイミド部分を作製する。抗ペプチドAb-F(ab')<sub>2</sub>をシステインで還元し、精製して回収した抗ペプチドFab'-SHを抗CEA-Fab'-マレイミドと反応させてFab'×Fab'二重特異性Abを作製する。あるいは、抗ペプチドFab'-SHフラグメントを抗CEA-F(ab')<sub>2</sub>とカップリングさせてF(ab')<sub>2</sub>×Fab'構築物を作製するか、抗CEA-IgGとカップリングさせてIgG×Fab'二重特異性構築物を作製することができる。1つの実施形態では、部位特異的様式での過ヨウ素酸塩酸化されている抗CEA-IgG重鎖炭水化物への抗ペプチドFab'チオール基の結合によってIgG×Fab'構築物を調製し、その後市販のヒドラジド-マレイミド架橋剤との反応によって活性化することができる。使用した成分Abを、公知の技術によってキメラ化またはヒト化することができる。キメラ抗体は、げっ歯類抗体由来の可変ドメインおよび相補性決定領域を含み、残りの抗体分子がヒト抗体に由来する組換えタンパク質である。ヒト化抗体は、モノクローナル抗体のマウス相補性決定領域をマウス免疫グロブリンの重鎖および軽鎖の可変鎖からヒト可変ドメインに導入された組換えタンパク質である。

#### 【0027】

種々の組換え法を使用して、多特異性抗体および抗体フラグメントを産生することができる。例えば、多特異性抗体および抗体フラグメントを、トランスジェニック家畜のミルクで産生することができる。例えば、Colman,A., Biochem.Soc.Symp., 63、141-147、1998および米国特許第5,827,690号を参照のこと。対合免疫グロブリン重鎖および軽鎖をコードするDNAセグメントをそれぞれ含む2つのDNA構築物を調製する。哺乳動物上皮細胞中で発現することが好ましいプロモーター配列を含む発現ベクターにフラグメントをクローン化する。例には、ウサギ、ウシ、およびヒツジのカゼイン遺伝子、ウシαラクトグロブリン遺伝子、ヒツジβラクトグロブリン遺伝子、ならびにマウスホエイ酸タンパク質遺伝子が含まれるが、これらに限定されない。好ましくは、挿入されたフラグメントを、哺乳動物特異的遺伝子由来の同族ゲノム配列によってその3'側に隣接させる。これにより、ポリアデニル化部位および転写物安定化配列が得られる。発現カセットを受精哺乳動物の卵の前核に同時注入し、その後レシビエント雌の子宮に移植して妊娠させる。出生後、子孫を、サザン分析によって両導入遺伝子の存在についてスクリーニングする。存在すべき抗体について、両重鎖および軽鎖遺伝子は、同一の細胞中で同時に発現されなければならない。トランスジェニック雌由来のミルクを、当分野で公知の標準的な免疫学的方法を使用して抗体または抗体フラグメントの存在および機能性について分析する。抗体を、当分野で公知の標準的方法を使用してミルクから精製することができる。

#### 【0028】

ヒト抗体由来のCドメインをコードするフラグメントへのマウス軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインをコードするcDNAフラグメントのライゲーションによってキメラAbを構築する。Cドメインは抗原結合に寄与しないので、キメラ抗体は元のマウスAbと同一の抗原特異性を保持するが、配列はヒト抗体に近い。キメラAbは依然としていくつかのマウス配列を含むが、依然として免疫原性を示し得る。ヒト化Abは抗原認識に必要なマウスアミノ酸のみを含む。ヒト抗体フレームワークへのマウス相補性決定領域由来のアミノ酸の構築によってこの産物を構築する。

#### 【0029】

他の最近のmsAb産生方法は、より一般的な免疫グロブリンイソ型よりも強力に架橋す

10

20

30

40

50

るようにさらなるシステイン残基を有する改変組換え A b を含む。例えば、FitzGeraldら、Protein Eng., 10(10)、1221-1225、1997を参照のこと。別のアプローチは、必要な二重特異性を有する2つまたはそれ以上の異なる一本鎖抗体または抗体フラグメントセグメントに架橋した組換え融合タンパク質を操作することである。例えば、Colomaら、Nature Biotech., 15、159-163、1997を参照のこと。分子操作を使用して種々の多特異性融合タンパク質を産生することができる。1つの形態では、多特異性融合タンパク質は1価であり、例えば、1つの抗原について1つの結合部位を有する s c F v および第2の抗原について1つの結合部位を有する F a b フラグメントからなる。別の形態では、多特異性融合タンパク質は2価であり、例えば、1つの抗原について2つの結合部位を有する I g G および第2の抗原について2つの結合部位を有する2つの s c F v からなる。

10

#### 【0030】

Diabodyとも呼ばれる機能的多特異性一本鎖抗体 (m s c A b : multi-specific single-chain antibody) を、組換え法を使用して哺乳動物細胞で産生することができる。例えば、Mackら、Proc. Natl. Acad. Sci., 92、7021-7025、1995を参照のこと。例えば、m s c A b を、組換え法を使用したグリシン-セリンリンカーを介した2つの一本鎖 F v フラグメントの連結によって産生する。目的の2つの抗体の V 軽鎖 (V<sub>L</sub>) および V 重鎖 (V<sub>H</sub>) ドメインを、標準的な P C R 法を使用して単離する。次いで、各ハイブリドーマから得た V<sub>L</sub> および V<sub>H</sub> の c D N A を2工程融合 P C R において連結させて一本鎖フラグメントを形成させる。第1の P C R 工程で (G l y<sub>4</sub>-S e r<sub>1</sub>)<sub>3</sub> リンカーを導入し、第2の工程では V<sub>L</sub> および V<sub>H</sub> アンプリコンを連結する。各一本鎖分子を、細菌発現ベクターにクローン化する。増幅後、一本鎖分子の1つを切り出し、第2の目的の一本鎖分子を含む他のベクターにサブクローン化する。得られた m s c A b フラグメントを、真核生物発現ベクターにサブクローン化する。チャイニーズハムスター卵巣細胞へのベクターのトランスフェクションによって機能性タンパク質発現を得ることができる。多特異性融合タンパク質を、類似の様式で調製する。多特異性一本鎖抗体および多特異性融合タンパク質は、本発明の範囲内に含まれる。

20

#### 【0031】

2つまたはそれ以上の異なる一本鎖抗体または抗体フラグメントに連結した多特異性融合タンパク質を、上記と類似の様式で産生する。組換え法を使用して、種々の融合タンパク質を産生することができる。例えば、ヒト化モノクローナル抗 C E A 抗体由来の F a b フラグメントおよびマウス抗 J D T P A 由来の s c F v を含む融合タンパク質を産生することができる。グリシルーグリシルーグリシルーセリンの三量体である (G G G S)<sub>3</sub> などの可撓性リンカーは、s c F v を抗 C E A 抗体の重鎖の定常領域に連結させる。あるいは、s c F v を、h M N-14 の軽鎖の定常領域に連結させることができる。重鎖 F d の s c F v へのインフレーム接続に必要な適切なリンカー配列を、P C R 反応によって V λ および V κ ドメインに移入する。次いで、s c F v をコードする D N A フラグメントを、C H 1 ドメインをコードする D N A 配列を含むステージング (staging) ベクターにライゲーションする。得られた s c F v -C H 1 構築物を切り出し、抗 C E A 抗体の V H 領域をコードする D N A 配列を含むベクターにライゲーションする。得られたベクターを使用して、多特異性融合タンパク質発現のために哺乳動物細胞にトランスフェクトすることができる。

30

40

#### 【0032】

大腸菌発現系を使用して、大量の b s c A b および融合タンパク質を産生することができる。例えば、Zhenpingら、Biotechnology, 14、192-196、1996を参照のこと。2フラグメントの V<sub>L</sub> および V<sub>H</sub> ドメインが異なるポリペプチド鎖上に存在する2つの「重複」 s c F v フラグメントの大腸菌での同時発現によって機能性 b a s c A b を産生することができる。目的の2つの抗体の V<sub>L</sub> および V<sub>H</sub> ドメインを、標準的な P C R 法を使用して単離する。次いで、目的の第1の抗体の V<sub>L</sub> ドメインの C 末端がリンカーを介して第2の抗体の V<sub>H</sub> ドメインの N 末端にライゲーションされるように c D N A を細菌発現ベクターにライゲーションする。同様に、目的の第2の抗体の V<sub>L</sub> ドメインの C 末端を、リンカーを介して第

50

1の抗体のV<sub>H</sub>ドメインのN末端にライゲーションする。得られたバイシストロン性オペロンを、強力プロモーター（例えば、リン酸枯渴によって誘導される大腸菌アルカリホスファターゼプロモーター）の転写調節下におく。あるいは、lacプロモーターおよび2%グリシンおよび1% TritonX-100からなる培地を使用して、一本鎖融合構築物を大腸菌中に首尾よく発現させる。例えば、Yangら、Appl. Environ. Microbiol., 64, 2869-2874, 1998を参照のこと。大腸菌の熱安定性エンテロトキシンIIシグナル配列を使用して、ペプチドを細胞膜周辺腔に向ける。分泌後、2つのペプチド鎖を結合させて、両方の抗原結合特異性を有する非共有結合ヘテロ二量体を形成する。当分野で公知の標準的手順（例えば、ブドウ球菌プロテインAクロマトグラフィ）を使用して、bscAbを精製する。

#### 【0033】

機能性bscAbおよび融合タンパク質を、トランスジェニック家畜のミルクで産生することもできる。例えば、Colman, A., Biochem. Soc. Symp., 63, 141-147, 1998、米国特許第5,827,690号を参照のこと。上記のようにして得たbscAbフラグメントを、哺乳動物上皮細胞で優先的に発現するプロモーター配列を含む発現ベクターにクローン化する。例には、ウサギ、ウシ、およびヒツジのカゼイン遺伝子、ウシ $\alpha$ -ラクトグロブリン遺伝子、ヒツジ $\beta$ -ラクトグロブリン遺伝子、およびマウスホエイ酸タンパク質遺伝子由来のプロモーターが含まれるが、これらに限定されない。挿入したbscAbは、哺乳動物特異的遺伝子由来の同族ゲノム配列によってその3'側に隣接していることが好ましい。これにより、ポリアデニル化部位および転写安定化配列が得られる。次いで、発現カセットを哺乳動物受精卵の前核に注入し、その後レシピエント雌の子宮に移植して妊娠させる。出生後、子孫を、サザン分析によって移入したDNAの存在についてスクリーニングする。トランスジェニック雌由来のミルクを、当分野で公知の標準的な免疫学的方法を使用してbscAbの存在および機能性について分析する。当分野で公知の標準的方法を使用して、ミルクからbscAbを精製することができる。ミルクにおけるbscAbのトランスジェニック産生により、大量のbscAbを得る有効な方法が得られる。

#### 【0034】

トランスジェニック植物において、機能性bscAbおよび融合タンパク質を産生することもできる。例えば、Fiedlerら、Biotech., 13, 1090-1093, 1995、Fiedlerら、Immunotechnology, 3, 205-216, 1997を参照のこと。このような産生により、低コスト、大規模処理、および安定かつ長期の保存を含むいくつかの利点を得られる。上記のようにして得たbscAbフラグメントを、プロモーター配列を含み、かつタンパク質を小胞体に向けるためのシグナルペプチド配列をコードする発現ベクターにクローン化する。当業者は、発現産物を植物内の特定の位置に方向付けることができる種々のプロモーターを使用することができる。例えば、カリフラワーモザイクウイルス35S強力プロモーターを使用してタバコ植物における遍在性発現を行うことができ、種子特異的レグミンB4プロモーターを介して器官特異的発現を行う。当分野で公知の標準的方法にしたがって、発現カセットを形質転換する。サザン分析によって形質転換を評価する。当分野で公知の標準的な免疫学的方法を使用して、bscAbの存在および機能性についてトランスジェニック植物を分析する。当分野で公知の標準的方法を使用して、bscAbを植物組織から精製することができる。

#### 【0035】

さらに、トランスジェニック植物により、bscAbおよび融合タンパク質の長期保存が容易になる。室温で1週間の保存後、機能活性scFvタンパク質をタバコの葉から抽出した。同様に、室温で1年間保存したトランスジェニックタバコ種子は、scFvタンパク質またはその抗原結合活性の損失は認められない。

#### 【0036】

昆虫細胞中で機能性bscAbおよび融合タンパク質を産生することもできる。例えば、Mahiouzら、J. Immunol. Methods, 212, 149-160, 1998を参照のこと。昆虫ベースの発現系により、大量の同種で適切に折りたたまれたbscAbの産生手段が得られる。バキュロウイルスは、広範に使用されている昆虫細胞用の発現ベクターであり、組換え抗体分子に

10

20

30

40

50

首尾よく適用されている。例えば、Miler, L.K., Ann.Rev.Microbiol., 42, 177, 1988、B eiら、J.Immunol.Methods、186、245、1995を参照のこと。あるいは、誘導性プロモーターの転写調節下でのb s c A b構築物を含む安定な昆虫細胞株の作製によって、誘導性発現系を使用することができる。例えば、Mahiouzら、J.Immunol.Methods、212、149-160、1998を参照のこと。上記のようにして得たb s c A bフラグメントを、DrosophilaメタロチオネインプロモーターおよびヒトHLA-A2リーダー配列を含む発現ベクターにクローン化する。次いで、構築物を、D.melanogasterSC-2細胞にトランスフェクトする。大量の銅、亜鉛、またはカドミウムへの細胞の曝露によって、発現を誘導する。b s c A bの存在および機能性を、当分野で公知の標準的な免疫学的方法を使用して決定する。当分野で公知の標準的方法を使用して、精製b s c A bを得る。

10

#### 【0037】

本発明で使用したポリマーは、薬剤の1つの分子または複数の分子が付着し得る骨格を提供することを意味する。本明細書中で使用される、「複数の分子」は、1つを超える分子を意味する。さらに、1種類を超える薬剤を同一の骨格に付着させて、複数の薬剤を1つのポリマーに送達させることができる。このポリマー骨格に付着させることができる薬剤は、性質（立体化学、化学式、放射性同位体数、原子量、半減期、活性、特異性、活性化エネルギー、放射能、および有効性が含まれるが、これら限定されない）が異なり得る。

#### 【0038】

本発明のポリマーおよびポリマー骨格の例は、ポリスチレン、ポリグルタミン酸（E；一文字コード）、およびアスパラギン酸（D）（これのD-アミノ酸アナログを含む）などの1種のアミノ酸のポリマーである。1つの実施形態では、最終m s A b/ポリマー複合系を使用した場合にポリマー複合物を認識するm s A bのアームが完全に特異的であることを確かめるために、非天然アミノ酸（例えば、D-アミノ酸）を骨格構造に組み込む。本明細書中で使用される、「コポリマー」は、2種またはそれ以上のアミノ酸のポリマー（3種のアミノ酸のポリマー、4種のアミノ酸のポリマー、および5種のアミノ酸のポリマーが含まれるが、これらに限定されない）を意味する。ポリ（L y s - G l u）{ポリ[K E]}などのコポリマーは、所望の比での基礎単位でこのようなコポリマーを選択する場合に特に有用である。これらの比は、ポリ[K E]またはポリ[K D]の場合に1：10から10：1までが有利であり得る。ポリ（L y s - A l a - G l u - T y r）（K A E Y；5：6：2：1）などのアミノ酸基礎単位に基づくより複雑なコポリマーを使用することもできる。使用されるポリマーの分子量は、一般に、1,000から100,000ダルトンの範囲内である。アミノ酸基礎単位を、認識ハプテンおよび治療薬のキャリアとして作用する能力だけでなく、個々の基礎単位をポリマー複合物全体に合わせて作製する物理的および生物学的性質についても選択する。例えば、好ましいポリマー複合物は、多数の疎水性薬物部分が置換した場合でさえも適切な安定性を保持するものである。ポリペプチドの場合、これはしばしば荷電残基が多数存在することを意味する。正味で正電荷を有する薬剤は時折細胞および組織に非特異的に結合するおそれがあるので、生理学的pHにおいて正味で負電荷を保持する最終ポリマー複合物でさらなる好ましい性質が得られる。ポリペプチドの場合、アスパラギン酸およびグルタミン酸などの酸性残基を優勢にすることにより、最も容易にこの基準が満たされる。第3の好ましい性質は、ポリマー骨格がエステラーゼなどの血清酵素ならびにカルボキシおよびアミノペプチダーゼに安定であることである。この優勢のために、ポリペプチドにDアミノ酸を組み込み、N末端およびC末端をそれぞれアシル化およびアミド化することができる。好ましい分子量範囲に関して、5,000と25,000との間のベースポリマーの分子量が特に好ましい。

20

30

40

#### 【0039】

しかし、完全に定義された分子量を有する、より小さいポリマー複合物もまた、本発明の範囲内で好ましい。2～50残基鎖長のポリペプチドが容易に産生される固相ペプチド合成技術によって化学的に定義された物質としてこれらを産生することができる。正確な構造が定義される以外のこの試薬型の第2の利点は、鎖中の一定の点に1つまたは任意の所望の数の化学結合手を置く能力である。各部分の選択レベルでの認識ハプテンおよび治療

50

薬の付着のためにこれらをその後に使用することができる。例えば、好ましい薬剤は、2つのリジン単位を含む38Dグルタミン酸残基の40量体（前者はDTPAなどの認識部位によりε置換されている）である。次いで、残存するグルタミン酸残基を、タキソール、10-ヒドロキシカンプトセシン、2-ピロリノドキシソルビシン、またはメルファランなどの化学療法薬に部分的に置換する。次いで、残存するグルタミン酸残基を、タキソール、10-ヒドロキシカンプトセシン、2-ピロリノドキシソルビシン、またはメルファランなどの化学療法薬に部分的に置換する。添加した薬物の疎水性に依存して、置換比は変化する。また、認識ハプテンの選択はまた、最終複合物の全体的な水溶性に影響を与え、この目的のために、DTPAなどの親水性部分が特に好ましい。一般に、ポリマーに対する薬物の置換比は、利用可能な部位の10～50%であり、概説した所望の物理的性質の維持に十分な非置換残基を残す。

10

## 【0040】

本発明の範囲内でポリペプチド以外のポリマーを使用することができる。ポリ（エチレン）グリコール〔PEG〕は多特異性抗体プロドラッグアプローチのための所望のインビボ特性を有し、ポリマーの末端に異なる化学官能基を有する種々の形態で得ることができる。ほとんどのPEG誘導体は、いずれかのポリマー鎖の末端に2つの機能性活性部位のみを有する。このようなPEG由来の薬剤（例えば、ジ- $\text{SN}-38\text{-PEG}$ など）は、 $\text{SN}-38$ -ポリマープロドラッグクラスの最も短いメンバーと考えることができる。PEG誘導体の所望のインビボ特性を、その二量体機能性による負荷能力の制限によって釣り合いを取る。しかし、より最近では、Poianiら（Bioconjugate Chem., 5, 62-630, 1994）などのハプテン保有能力がより高いPEGコポリマーの調製が記載されている。PEGのビス（スクシニミジル）カーボネート誘導体などの両末端が活性化されたPEG誘導体を、リジンなどの多機能性ジアミンと共重合する。リシルカルボキシル基が重合プロセスに関連しない（ $-\text{Lys}(\text{COOH})-\text{PEG}-\text{Lys}(\text{COOH})-\text{PEG}-$ ）<sub>n</sub>反復単位を含むこのような共重合生成物を、DTPAなどのハプテン残基または $\text{SN}-38$ などの薬物残基の付着のために使用することができる。DTPAなどのハプテンまたは $\text{SN}-38$ などの薬物を、PEG-ポリリシル複合物の末端上に残存する遊離のカルボキシル基と反応させることもできる。最も好ましくは、大量のアミノ酸含有量を使用し、薬物をアミノ酸側鎖に付着させる。認識ハプテンを、PEG誘導体の末端に添加する。

20

## 【0041】

認識ハプテンおよび薬物を保有するために使用することができる他の合成ポリマーには、 $\text{N}-(2\text{-ヒドロキシプロピル})$ メタクリルアミド（HMPA）コポリマー、ポリ（スチレン-無水マレイン酸コポリマー（SMA: polystyrene-co-maleic acid/anhydride）、ポリ（ビニルエーテル無水マレイン酸）（DIVEMA）、ポリエチレンイミン、エトキシ化ポリエチレンイミン、スターバーストデンドリマー、およびポリ（ $\text{N}$ -ビニルピロリドン）（PVP）が含まれる。例として、多数の無水物単位から構成されるDIVEMAポリマーを限定量の $\text{SN}-38$ と反応させて、ポリマー骨格上の薬物の所望の置換比を得る。残存する無水物基を水性条件下で切断して、遊離のカルボン酸基を得る。限定数の遊離カルボン酸基を標準的な水溶性ペプチドカップリング剤（例えば、EDAC）〔貢献者：定義のこと〕を使用して活性化し、遊離アミノ基を有する認識部分とカップリングさせる。抗体が既に化合物のHSG部分に対して惹起しているので、後者の例は、ヒスタミンル-スクシニル-グリシル-リジンアミド（HSGK- $\text{NH}_2$ ）である。次いで、遊離εリジン残基は、認識ハプテンのポリマー骨格への付着点となる。最後に、一定の例では、使用ポリマーは天然に存在するポリマーであり得る。この例は、7個の遊離チオール基を有する低分子量タンパク質のアポメタロチオネイン（apometallothionein）の使用である。このタンパク質をジスルフィド交換によってカリケアミシン（calicheamicin）とカップリングさせて、ジスルフィド結合したポリカリケアミシン複合物を生成する。さらに、タンパク質は、任意の薬物複合化の前に、DTPA、DOTA、HSGなどの認識ハプテンを有するように改変された限定数のリシル残基を有し得る。

30

40

## 【0042】

50

放射性核種および認識ハプテンの保有に有用なポリマーを、特定の放射性核種の保有についてのその適合について選択する。ポリマー骨格はアミノ酸からなる場合、例えば、全骨格アミノ酸はDまたはL型であっても、これらの型が混合していてもよい。例えば、放射性核種<sup>131</sup>ヨウ素の保有に有用なポリマーには、純粋にD型チロシンアミノ酸から作製されたポリマーおよびポリ(Glu, Tyr) [1:1]、ポリ(Glu, Tyr) [4:1]、およびポリ(Lys, Ala, Glu, Tyr) [5:6:2:1]などの無作為なコポリマーが含まれる。これらの例では、ポリマーは、当分野で周知の方法を使用した放射性ヨウ素に容易に置換されるチロシンアミノ酸残基を含む。

#### 【0043】

1つの実施形態では、msAbの捕捉アームは、ポリマー複合物のポリマー骨格に付加した認識ハプテンを認識する。ポリマー複合物が個別の認識ハプテンを含む場合、ポリマー複合物の一般式は、(認識ハプテン)<sub>n</sub>-(ポリマー骨格)-(薬剤)<sub>m</sub>。(式中、nおよびmは0を含む整数である)である。しかし、nおよびmの両方を0にできない。mが0である場合、認識ハプテンは必ず標的部位に標的される薬剤として作用する。同様に、nが0である場合、ポリマー骨格または薬剤は、捕捉アームのハプテンまたは抗原として作用する。

#### 【0044】

認識ハプテンの例には、ジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)の金属イオンキレートが含まれるが、これらに限定されない。少なくとも2つの独立した研究所によって、抗体はインジウム-DTPAに対して反応性を示した。低分子量複合体として放射免疫診断および放射免疫治療で使用する場合、このような金属キレートは、これらが腫瘍予備ターゲットインジウムmsAbに結合しない場合に泌尿器系を介して迅速に排泄されるという望ましい性質を有する。この認識系の型では、抗体は、遊離のキレート剤またはキレート(キレート剤の金属複合体)に対して反応性を示す。さらに、インジウム-DTPAに対する抗体は、キレート剤が異なる金属と複合体化する場合にDTPAに対して異なる親和性を有し得る、または有する。多特異性抗体の捕捉アームを、キレートによって保持された簡単に変化する金属によって親和性を調整することができるので、これを有利に使用することができる。1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-N, N', N'', N'''-四酢酸(DOTA)またはN, N'-ジ[2-ヒドロキシ-5-(エチレン-3-カルボキシ)ベンジル]エチレンジアミンN, N'-二酢酸(HBED)などの他の金属キレート剤に対して抗体を惹起することもできる。大環状キレートDOTAに対して惹起された抗体は、中心の環が立体的に強固であるので、より多くの異なる金属置換基を受け取ることができる。したがって、種々の金属置換基を有するか、金属をまったく含まない場合でさえも、抗DOTA mAbを使用することができる。好ましい実施形態では、本発明のmsAbは、DOTAまたはDOTAの金属複合体を認識または結合する捕捉アームを含む。

#### 【0045】

本発明の認識ハプテンは、キレートまたは金属キレートである必要がない。強力な免疫応答を得ることができる他の低分子量の分子を使用して抗体を調製することができる。これの例は、抗体が惹起された親水性種であるヒスタミニルスクシニルグリシン(HSG)ハプテンである。679と呼ばれる1つの特定の抗体が科学論文で広く記載されている。多特異性抗体の捕捉アームのこの型および抗キレート型を、天然で親水性を示し、低分子量の診断薬および治療薬と共に使用されるようにデザインした。本発明を使用して、ポリマーにより最終治療薬の大部分の物理的性質が与えられるので、この上記の親水性の高さはあまり厳密ではない。同様に、これによりインビボ条件下で有用な抗体の惹起に使用することができるはるかにたくさんの免疫原を意図することができる。一般的に使用されている免疫原には、フルオレセインおよび2, 4-ジニトロフェニル誘導体などが含まれる。さらに、認識ハプテンには、ペプチドまたは他の分子内に含まれるアミノ酸残基を含み得る。

#### 【0046】

あるいは、ポリマー骨格自体に含まれるエピトープを認識ハプテンとして使用することが

10

20

30

40

50

できる。

#### 【0047】

最適な薬物(a drug of choice)が置換されたポリマーを、KLHなどの周知の免疫原性剤に付着した最適な薬物と同様に、免疫原として使用することもできる。ポリマーまたは薬物-ポリマー複合物を、免疫原性を増強するために高分子と付着させることができ、この複合物を免疫原として使用し、標準的な方法を使用して抗体発現についてのスクリーニングを行った。特定の薬物に対する抗体の産生は有利であり得る一方で、ポリマー骨格に対する抗体の産生は「普遍的」認識MAbの産生に有利であり得る。したがって、DTPA、HSG、またはDOTAなどの個別の認識単位を使用する場合、二次抗体認識単位はいかなる特定の薬物とも関連せず、同一のポリマー骨格に複合化した種々の薬物に対して同一のmsAbを使用することができる。2つの異なるポリマー-薬物複合物を現在の併用化学療法と類似の状況で組み合わせて使用する場合（異なる作用様式でのいくつかの薬物の使用における利点を得るため）、この実施形態は有用である。

10

#### 【0048】

ポリマー複合物の認識ハプテンは、公知の免疫原認識部分（例えば、公知のハプテン）を含み得る。公知のハプテン（例えば、フルオレセインイソチオシアネート（FITC））を使用して、抗体に対するポリマー複合物の特異性を高める。ハプテンに対して惹起された抗体が公知であり、本発明の多特異性抗体に組み込むことができるので、これが起こる。したがって、付加したキレート剤またはキレートとのポリマー複合物の結合は、本発明の抗体または抗体フラグメントに対する特異性が高い。ポリマー複合物に付加されるべきハプテンの別の例は、ビタミンB12である。抗B12 mAbは公知であり、遊離血清B12は存在しないので、ビタミンB12の使用は有利である。したがって、抗体に対して高い特異性を示し得る。

20

#### 【0049】

別の実施形態では、画像化および／または治療に使用される放射性核種を、元の認識ハプテンの設計に組み込むことができる。例えば、Ac-Gly-D-ヨード-Tyr-D-Trp-Gly-D-Lys(Ac)-Gly-D-ヨード-Tyr-D-OHを、ヨウ素含有ペプチドと反応性を示す抗体の惹起という明確な目的の免疫原として使用することができるが、同一のペプチドの非ヨードバージョン（すなわち、Ac-Gly-D-Tyr-D-Trp-Gly-D-Lys(Ac)-Gly-D-Tyr-D-Trp-OH）は使用できない。後者を超える前者に対する抗体(Ab)の特異性を、標準的スクリーニング技術を使用して証明することができる。この実施形態で特に重要なものは、放射免疫アッセイ(RAIT)のために $\alpha$ 粒子放出アスタチンで置換されたペプチドを認識するAb、したがってmsAbを作製するための免疫原としてのアスタチン置換ペプチドの使用である。他の実施形態では、任意のハプテンを、例えば、<sup>18</sup>Fッ素、臭素、およびヨウ素の核種（例えば、<sup>124</sup>ヨウ素、および<sup>123</sup>ヨウ素）を含む元の免疫原の設計に組み込むことができる。同様に、他の非金属（例えば、<sup>32</sup>P、<sup>33</sup>P、および<sup>35</sup>S）を使用することができる。

30

#### 【0050】

薬物ハプテンを有するポリマーと同様に、本発明で使用されるmsAbを、ポリマー骨格、放射性核種含有ハプテン、または放射性核種部分から離れたハプテンに対して惹起することができる。個別の数の認識部分（例えば、1つまたは2つのみ）を付加した放射性核種-ハプテンの数と無関係にポリマーに添加することができるので、後者の実施形態が特に好ましい。インジウム-DTPAおよびDOTAならびに他の認識ハプテンなどの特異的放射性各種ハプテンに対して抗体を惹起した。1つの顕著な例は、低分子量のハプテンHSGに対して惹起した679と呼ばれる抗体である。

40

#### 【0051】

任意の有用な核種は、本発明の範囲内であり得る。<sup>111</sup>インジウムまたは<sup>90</sup>イットリウムなどそれぞれの有用な診断または治療特性を有する放射性核種が特に好ましい。他の有用な核種には、<sup>18</sup>F、<sup>32</sup>P、<sup>47</sup>Sc、<sup>62</sup>Cu、<sup>64</sup>Cu、<sup>67</sup>Cu、<sup>67</sup>Ga、<sup>68</sup>Ga、<sup>86</sup>Y、<sup>90</sup>

50



Y、<sup>89</sup>Zr、Tc-99m、<sup>109</sup>Pd、<sup>111</sup>Ag、<sup>111</sup>In、<sup>123</sup>I、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I、<sup>153</sup>Sm、<sup>155</sup>Gd、<sup>157</sup>Gd、<sup>161</sup>Tb、<sup>177</sup>Lu、<sup>186</sup>Re、<sup>188</sup>Re、<sup>197</sup>Pt、<sup>212</sup>Pb、<sup>212</sup>Bi、<sup>213</sup>Bi、<sup>223</sup>Ra、および<sup>225</sup>Acが含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0052】

放射性金属核種の強固な結合には、放射性金属のためのキレート剤がしばしば必要となる。タンパク質アポメタロチオネインなどの天然に存在するポリマーキレート剤を使用することができる。低分子量キレートの放射性標識で使用される標準的な放射性標識方法および注意を使用して、放射性標識キレートポリマーを調製することができる。例えば、<sup>111</sup>インジウムおよび<sup>90</sup>イットリウムなどの放射性金属を使用した手順には、一般に、純度の高い放射性核種の供給物、脱イオン水を含む全ての緩衝液、ならびに放射性標識手順の間に任意の試薬で使用されるガラス器具およびプラスチック器具の酸洗浄が必要である。放射性標識反応に伴って低酸素緩衝液およびアルゴン雰囲気を使用した、標識を行うために化学的還元工程が必要な<sup>188</sup>レニウムなどの放射性金属を使用した手順を行うことが最良である。

10

#### 【0053】

ポリマー複合物を、罹患組織の治療または同定に有用な種々の薬剤に複合化させることができる。ポリマー複合物に複合化する薬剤は、治療薬、ペプチド、酵素、および標識リガンドからなる群から選択されることが好ましい。本明細書中で使用される、用語「治療薬」を、標的組織内での細胞または生理学的応答を生じさせるか、誘発するか、開始させる任意の化合物または分子を意味するために使用する。当業者に自明であるべき細胞または生理学的応答の例には、イオン流入もしくは流出、セカンドメッセンジャー経路の開始、DNA合成、mRNAの翻訳、細胞の細胞周期の開始、細胞の細胞周期の停止、エンドサイトーシス、細胞からの分子の放出、エキソサイトーシス、内在化リガンドに対して作用する細胞質ゾルタンパク質、非プログラム細胞死（細胞毒性）、およびアポトーシスが含まれるが、これらに限定されない。本発明で使用される治療薬の例には、金属キレート複合体、薬物、プロドラッグ、放射性核種、ホウ素追加物(boron addends)、標識化合物、毒素、および他の効果分子（サイトカイン、リンホカイン、ケモカイン、免疫調節物質、放射線増感剤、アスパラギナーゼ、ホウ素追加物、および放射性ハロゲンなど）が含まれるが、これらに限定されない。好ましくは、ポリマー骨格に複合化する治療薬は、治療用放射性同位体、毒素、薬物、プロドラッグ、およびホウ素追加物からなる群から選択される。

20

30

#### 【0054】

本明細書中で使用される、用語「薬剤、リガンド、または化合物」は、タンパク質、核酸、炭水化物、脂質、ポリマー、または小分子を意味することが意図される。

#### 【0055】

本発明で使用される薬物には、ポリマー複合物に付加することができる限り、現在承認されているか依然として承認されていない任意の化学療法薬が含まれるが、これらに限定されない。典型的には、有用な既に承認されている薬物には、以下の薬剤およびこれらの薬剤の誘導体が含まれるが、これらに限定されない。アナストロゾール、アザシチジン、プレオマイシン、ブスルファン、カルボプラチン、カルムスチン、クロラムブシル、シスプラチン、クラドリビン、シクロホスファミド、シタラビン、ダカルバジン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドセタキセル、ドキソルビシン、エストラムスチン、エトポシド、フロクスウリジン、フルダラビン、フルオロウラシル、フルタミド、ゲムシタビン、ヒドロキシウレア、イダルビシン、イフォスファミド、イリノテカン、ロムスチン、メクロレタミン、メゲストロール、メルファラン、メルカプトプリン、メトトレキセート、マイトマイシン、ミトタン、ミトザントロン、パクリタキセル、ペントスタチン、プロカルバジン、タモキシフェン、テニポシド、チオグアニン、チオテパ、トボテカン、ビンブラスチン、ピンクリスチン、およびビノレリビン。

40

#### 【0056】

さらに、ポリマー複合物は、ホウ素中性子捕捉療法(BNCT: Boron Neutron Capture T

50

herapy) プロトコールで使用するべきホウ素追加物からなる治療薬を含み得る。BNCTは、腫瘍局在化<sup>10</sup>ホウ素原子の中性子照射によって腫瘍細胞に電離放射線を送達させるようにデザインされたバイナリシステムである。BNCTは、安定な同位体（同位体が豊富な<sup>10</sup>B）（天然存在度19.8%で存在する）を熱中性子で照射して、 $\alpha$ 粒子および<sup>7</sup>Li核が生成される場合に起こる核反応に基づく。これらの粒子の路程は約1細胞直径であり、高い線エネルギー付与が得られる。この核反応によって生成したたった数個の短距離1.7 MeV  $\alpha$ 粒子で細胞核の標的およびその破壊に十分である。癌のBNCTを成功させるには、腫瘍部位で高濃度の<sup>10</sup>ホウ素を局在化させ、本質的にホウ素を含まない非標的器官を遊離させる方法が必要である。BNCTのための予備ターゲティングmsAbを使用した患者の腫瘍治療のための組成物および方法は、本発明によって容易に改変することができ、本明細書中で参照して組み込まれる、米国特許第6,228,362号に記載されている。さらに、他の元素が中性子捕獲反応に適切である。1つの例はウラニウムである。大量のウラニウムを、フェリチンなどの天然に存在するキレート剤によって結合させることができる。このような戦略は当分野で記載されている（例えば、本発明に容易に適用可能であり、その全体が本明細書中で参照して組み込まれる米国特許第6,228,362号およびその引例）。

#### 【0057】

さらに、ペプチドおよび酵素をポリマー複合物に複合化することができる。ポリマー複合物に複合化する酵素およびペプチドは、プロドラッグの活性化、体内の解毒経路の調節による通常の治療薬の有効性の改良、補因子としての作用、他のタンパク質のリガンドとしての作用、または薬物の標的特異的毒性の増加に有用であり得る。

#### 【0058】

本発明の1つの実施形態では、msAbを最初に被験体に投与し、その後ポリマー-酵素複合物を投与する。酵素が標的部位に予備ターゲティングされた後、細胞傷害薬であって、標的部位で作用することが公知のもの、または予備ターゲティングされた酵素によってインサイチューで薬物に変換されるそのプロドラッグ形態を注射する。薬物は、哺乳動物の通常の解毒プロセスを使用して解毒されて、毒性の低い中間体（最も一般的にはグルクロニド）を形成するものである。解毒中間体（例えば、グルクロニド）は、予備ターゲティング酵素によってそのより有毒な形態に再変換され、それにより標的部位での細胞傷害性が増大する。これにより、薬物が再循環する。同様に、投与したプロドラッグは、通常の生物学的プロセスによって活性薬物に変換し得る。予備ターゲティングされた酵素は、解毒薬物の再循環によって治療有効性を改良する。このアプローチを、任意の酵素-薬物対の使用に適合させることができる。類似の予備ターゲティング戦略は、米国特許出願第09/399,021号に記載されている。これらの方法を本発明に容易に適用することができ、その全体が本明細書中で参照して組み込まれる。

#### 【0059】

別の実施形態では、被験体への投与前に酵素-ポリマー複合物をターゲティングmsAbと混合することができる。酵素-ポリマー-msAb複合物が標的部位に局在化し、非結合複合物が循環から除去されるのに十分な時間が経過した後、プロドラッグを投与する。上記のように、プロドラッグはその後予備ターゲティング酵素によってインサイチューで薬物に変換される。

#### 【0060】

本明細書中で使用される、用語「プロドラッグ」を、不活性状態で投与されてその後より活性な状態に変換される治療薬を意味するために使用する。さらに、プロドラッグを、投与時に活性化されて、その後より活性な状態に変換される薬剤を意味するためにも使用する。さらに、プロドラッグはまた、投与時のその活性に特異的ではなく、その後より特異的作用剤に変換されるのも意味し得る。上記のように、プロドラッグは、被験体内で変換してもしなくてもよい。変換はまた、プロドラッグが身体によってより活性であるか特異的である薬剤に天然に代謝される天然のプロセスであるか、より活性であるか特異的な状態にプロドラッグを変換させるためにさらなる薬剤を投与する合成プロセスであり得る。

## 【0061】

抗癌治療に有用な一定の細胞傷害薬は、比較的血清に不溶性である。非複合形態で非常に有毒なものもあり、その毒性はプロドラッグへの変換によって非常に減少する。溶解性の低い薬物のより溶解性の高い複合物（例えば、グルクロニド（親水性酸のエステルまたは親水性アミンのアミド））への変換により、血清の水相での溶解性および静脈、動脈、または毛細血管の細胞壁を通過して腫瘍が浸漬した間質液に到達する能力が改良される。プロドラッグの切断により、標的部位に低溶解性薬物が沈着する。このようなプロドラッグから薬物への変換の多数の例は、Hansenに付与された米国特許第5,851,527号に開示されている。

## 【0062】

肝臓における芳香族または脂環式アルコール、チオール、フェノール、ならびにアミンなどの一定の有毒物質のグルクロニドへの変換は、これらを解毒してより容易に尿中に排泄する体内での方法である。このような基質に変換することができる1つの抗腫瘍薬物の型は、アントラサイクリングリコシドであり、かつヒト $\beta$ -グルクロニダーゼの基質であることが示されているエピルビシン（ドキシソルビシンの4-エピマー（アドリアマイシン））である。例えば、Arcamone、Cancer Res., 45, 5995, 1985を参照のこと。極性基のより少ない他のアナログは、より親油性が高く、このようなアプローチに有望であると予想される。芳香族または脂環式アルコール、チオール、またはアミン基を含む他の薬物または毒素は、このような複合物形成の候補である。これらの薬物またはこれらの他のプロドラッグ形態は、本発明の部位特異的増強法に適切な候補である。

## 【0063】

プロドラッグCPT-11（イリノテカン）は、カルボキシエステラーゼによってインビボで活性代謝産物SN-38に変換される。SN-38は高度に有効な抗腫瘍薬であるにもかかわらず、その毒性のために薬用量を被験体に投与することができない。したがって、本発明の1つの適用は、腫瘍関連抗原およびハプテン（例えば、ジDTPA）に特異的なmAbを使用してこのような治療薬を腫瘍部位にターゲティングし、その後ジDTPA-カルボキシエステラーゼ-ポリマー複合物を注射することである。一旦適切な腫瘍：バックグラウンド局在化比が達成されると、CPT-11を投与し、腫瘍局在化カルボキシエステラーゼは腫瘍でCPT-11をSN-38に変換するように作用する。その溶解性の低さにより、腫瘍周囲に活性SN-38が残存し、それによりターゲティングされた抗原に陰性の隣接腫瘍細胞に効果を発揮する。これは、より有益な方法である。カルボキシエステラーゼの修飾形態は記載されており、本発明の範囲内である。例えば、Pott

## 【0064】

erら、Cancer Res., 58, 2646-2651および3627-3632, 1998を参照のこと。

エトポシドは、グルクロニドの形成によって広範囲を解毒する広範に使用されている癌治療薬であり、本発明の範囲内である。例えば、Handeら、Cancer Res., 48, 1829-1834, 1988を参照のこと。グルクロニド複合物を細胞傷害薬から調製し、mAb-グルクロニド複合物で予備ターゲティングした腫瘍の治療薬として注射することができる。例えば、Wangら、Cancer Res., 52, 4484-4491, 1992を参照のこと。したがって、このような複合物を、本明細書中に記載の予備ターゲティングアプローチと共に使用することもできる。同様に、カルボキシエステラーゼおよびグルクロニダーゼと共に使用するためのダウノマイシンの誘導体に基づいてデザインされたプロドラッグおよびドキシソルビシンが記載されている。例えば、Bakinaら、J. Med. Chem., 40, 4013-4018, 1997を参照のこと。本発明で 사용할ことができるプロドラッグ/酵素対の他の例には、フェノールマスタードおよび $\beta$ -グルクロニダーゼのヒドロキシ誘導体のグルクロニドプロドラッグ；フェノールマスタードもしくはCPT-11およびカルボキシペプチダーゼ；メトトレキセート置換 $\alpha$ -アミノ酸およびカルボキシペプチダーゼA；6-メルカプトプリンおよびドキシソルビシンおよび $\beta$ -ラクタマーゼなどの薬物のペニシリンまたはセファロスポリン複合物；リン酸エトポシドおよびアルカリホスファターゼが含まれるが、これらに限定されない。

## 【0065】

本発明の他の実施形態では、体内の解毒経路の調節によって標的部位でプロドラッグを活性化するか通常の治療の有効性を改善することができる酵素を、認識ハプテンに複合化することができる。酵素-ハプテン-ポリマー複合物を、予備ターゲティング m s A b の投与後に投与し、標的部位に方向付ける。酵素が標的部位に局在した後、標的部位で作用することが公知の細胞傷害薬または予備ターゲティング酵素によってインサイチューで薬物に変換されるそのプロドラッグを注射する。上記のように、薬物は、哺乳動物の通常の解毒プロセスを使用して解毒されてより毒性の低い中間体（最も一般的には、グルクロニド）を形成するものである。解毒中間体（例えば、グルクロニド）は、予備ターゲティング酵素によってより有毒な形態に再変換され、それにより標的部位での細胞傷害性が増大する。これにより、薬物が再循環する。同様に、投与したプロドラッグは、正常な生物学的プロセスによって活性薬物に変換し得る。予備ターゲティング酵素は、解毒薬物の再循環によって治療有効性を改良する。このアプローチを、任意の酵素-薬物対の使用に適合させることができる。別の実施形態では、酵素-ハプテン-ポリマー複合物を、被験体への投与前にターゲティング m s A b と混合することができる。酵素-ハプテン-ポリマー- m s A b 複合物が標的部位に局在化し、非結合複合物が循環から除去されるのに十分な時間が経過した後、プロドラッグを投与する。上記のように、プロドラッグはその後予備ターゲティング酵素によってインサイチューで薬物に変換される。

#### 【0066】

本発明の別の実施形態では、ポリマー複合物をプロドラッグに複合化することができる。予備ターゲティング m s A b を被験体に投与し、標的に局在化させ、その後循環で除去される。適切な期間後、プロドラッグ（例えば、ポリグルタミン酸（S N-38-エステル）<sub>10</sub>）を含むポリマー複合物を投与し、それによりプロドラッグが腫瘍標的に特異的に局在化する。腫瘍内および腫瘍周囲での速い細胞溶解速度により、腫瘍への細胞内供給源から放出される酵素の量が増大することが公知である。当業者は、適切に選択したプロドラッグがこれらの酵素によって活性化することができるというこの事実を利用することができる。例えば、カルボキシエステルゼは、ポリグルタミン酸（S N-38-エステル）<sub>10</sub> のエステル結合の切断によってプロドラッグであるポリグルタミン酸（S N-38-エステル）<sub>10</sub> を活性化して、腫瘍に高濃度の遊離 S N-38 を放出させる。あるいは、適切な酵素を、腫瘍部位にターゲティングすることもできる。

#### 【0067】

ポリマー複合物からの切断後、薬物は腫瘍細胞によって内在化される。あるいは、標的での架橋によってインタクトな複合体の一部として薬物を内在化することができる。ポリマー複合物は、腫瘍結合 m s A b の内在化を誘導して、それにより内在化されるべき高レベルの薬物により治療有効性を改善することができる。

#### 【0068】

種々のプロドラッグをポリマー複合物に複合化させることができる。上記のポリマーの使用例は、S N-38（プロドラッグ C P T-11 の活性代謝産物（イリノテカン））を使用して考慮されている。S N-38 は、エステラーゼ型酵素に感受性を示すアリアルエステルを生成するために上記説明で使用した芳香族水酸基を有する。同様に、化学療法で広く使用されているカンプトセシンアナログであるトポテカン<sup>®</sup>は、S N-38 と類似の様式で使用してエステラーゼ感受性ポリマー-プロドラッグを生成することができる利用可能な芳香族水酸基残基を有する。

#### 【0069】

ドキソルビシンはまた、カンプトセシンファミリーと類似の酸触媒反応を使用してカルボキシレート含有ポリマー複合物とカップリングさせることができる芳香族水酸基を含む。同様に、ダウノマイシン、エピルビシン、およびイダルビシンのようなドキソルビシンアナログを同様の様式でカップリングさせることができる。ドキソルビシンおよびポリマー複合物への化学結合に十分に活性なアミノ「化学結合手」を有する他の薬物を、多数の方法でこれらの遊離アミノ基を介して有効に複合物とカップリングさせることができる。遊離カルボン酸基を有するポリマーをインサイチューで活性化し、活性化したポリマーをド

10

20

30

40

50

キソルピシンと混合して、薬物をアミド結合を介してポリマーの側鎖に直接付着させることができる。アミノ含有薬物を、エチレングリコビス（スクシニミジルスクシネート）（EGS）（Pierce Chemical Co. Rockford, IL）またはビスー〔2-（スクシニミド-オキシカルボニルオキシ）エチル〕スルホン（BSOCOES）（Molecular Biosciences, Huntsville, AL）などの市販の切断可能な架橋剤との混合によってアミノ懸垂ポリマーとカップリングさせて、ビス（スクシニミジル）エステル基との反応後に2つのアミドとして2つのアミンを架橋することもできる。これらの基が酵素切断に対して感受性を示したままであるのでこれは有利である。例えば、（ドキシソルピシン-EGS）<sub>n</sub>-ポリリジンは、エステラーゼなどの酵素によるEGS結合鎖中のジエステル基の酵素切断に感受性を示すままである。ドキシソルピシンを、確立された手順（HyBn = p-H<sub>2</sub>NNHC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CO<sub>2</sub>H）を使用して種々のペプチド（例えば、HyBnK（DTPA）YK（DTPA）-NH<sub>2</sub>）に複合化させることもできる。Kanekoら、J. Bioconjugate Chem., 2, 133-141, 1991を参照のこと。

10

#### 【0070】

1つの好ましい実施形態では、ポリマー複合物に複合化させた治療薬は、DTPAが予備ターゲティングbsMAbの認識ハプテンを形成するDTPA-ポリマーペプチドドキシソルピシン複合物を形成するためのアミン残基およびキレート剤（DTPAなど）を含むポリマー複合物とカップリングするドキシソルピシンを含む。好ましくは、ポリマー複合物は、チロシル-リジンジペプチド（例えば、ポリ〔Ty r-L y s〕（DTPA）-NH<sub>2</sub>）を含み、より好ましくはさらにポリ〔L y s（DTPA）-Ty r-L y s（DTPA）〕-NH<sub>2</sub>を含む。ビス-DTPA含有ペプチドへのドキシソルピシンフェニルヒドラゾン複合物が治療に特に望ましい。

20

#### 【0071】

メトトレキセートはまた、ドキシソルピシンと類似の様式で活性化カルボン酸含有ポリマーへのカップリングに利用可能なアミノ基を有する。これは、アミノ基含有ポリマーへのカップリングのために活性化することができる2つのグルタミルカルボキシル基（αおよびγ）も有する。メトトレキセートの遊離のカルボン酸基をインサイチューで活性化し、活性化した薬物をアミノ含有ポリマーと混合し、アミド結合を介してポリマーの側鎖に薬物を直接付着させることができる。過剰な未反応または交差反応した薬物を、サイズ排除クロマトグラフィまたはイオン交換クロマトグラフィを使用してポリマー-薬物複合物から容易に分離する。

30

#### 【0072】

メイタンシノイドおよびカリケアミシン（エスペラマイシンなど）は、切断して化学的操作で有用な1つのチオールを含む化合物を生成することができる混合したジスルフィドおよびトリスルフィド結合を含む。チオメイテンシノイドまたはチオエスペラマイシンを、最初にペプチダーゼによる切断に感受性を示すマレイミド-ペプチドなどの架橋剤と反応させる。次いで、ペプチドのC末端を活性化し、ポリリジンなどのアミノ含有ポリマーにカップリングする。

#### 【0073】

さらに他の実施形態では、治療薬またはプロドラッグポリマーのインビボ標的への多特異性抗体指示送達を、併用化学療法および放射免疫治療を行うように放射性核種の多特異性抗体送達と組み合わせることができる。各治療薬をポリマー複合物に複合化して同時投与するか、第1のポリマー複合物の一部として核種を投与し、第2のポリマー複合物の一部として後の工程で薬物を投与することができる。1つの単純な実施形態では、1つのプロドラッグおよび1つの核種を含むポリマーを構築する。例えば、ポリマー骨格がペプチドポリマーから構成されるポリマー複合物を使用することができ、それによりSN-38がアリールエステルとしてγグルタミルカルボキシル基に付着し、キレートDOTAはアミドとしてεアミノ基に付着してポリマー-プロドラッグ-認識ハプテン複合体（例えば、ポリ〔Glu（SN-38）<sub>10</sub>-L y s（Y-90-DOTA）<sub>2</sub>〕）を生成する。次いで、DOTAキレートを、画像化および治療目的の種々の金属（<sup>111</sup>In、<sup>90</sup>Y、<sup>153</sup>Sm）

40

50

、 $^{177}\text{Lu}$ 、および $^{89}\text{Zr}$ が含まれる)で放射性標識することができる。金属DOTA複合体がポリマー複合物上に認識ハプテンを示すことができるので、DOTA複合体の一部として使用した金属の唯一の要件は、使用した二次認識抗体が十分な親和性の高さでこの特定の金属-DOTA複合体を認識することである。一般に、この親和性( $\log K_a$ )は、6~11である。また、認識ハプテンが放射免疫療法薬(治療薬)と無関係なように、ポリ $[\text{Glu}(\text{Sn}-38)_{10}-\text{Lys}(\text{Y}-90-\text{DOTA})_n]$ (ヒスタミン-スクシネート) $_n$ (式中、 $n$ および $m$ は整数である)などの三置換ポリマーを使用することができる。次いで、プロドラッグを、腫瘍部位に存在するカルボキシルエステラーゼまたは第2のポリマー複合物を使用して部位にターゲティングされたカルボキシルエステラーゼによって活性化する。

10

#### 【0074】

あるいは、個別の工程での化学療法薬および放射免疫療法薬の投与によって、併用療法を行うことができる。例えば、CEA腫瘍を発現する被験体に、CEAに特異的に結合する少なくとも1つのアーム、および認識ハプテンがイットリウム-DOTAの複合物であるポリマーに特異的に結合する少なくとも1つの他のアームを有する $m\text{ s Ab}$ を最初に投与する。その後、被験体を、イットリウム-DOTA- $\beta$ グルクロニダーゼの複合物を含むポリマー複合物で処置する。 $m\text{ s Ab}$ および酵素の局在化およびクリアランスが十分に行われた後、第2のポリマー複合物を投与する。第2のポリマー複合物は、第1のポリマー複合物に依然として結合していない腫瘍において、 $m\text{ s Ab}$ によって腫瘍に局在する。プロドラッグおよびその各酵素の標的部位への局在化により、酵素が基質を制限しないこと

20

#### 【0075】

核種を前に投与したポリマー複合物の一部として送達させた後の工程でのプロドラッグ-ポリマー投与の別の利点は、照射と薬物療法との相乗効果を操作して最大にすることができることである。照射損傷により、RAIT後に腫瘍はより「漏出」しやすくなると仮定される。これにより、ポリマー-プロドラッグを腫瘍により完全かつ深く侵入させることができる。これにより、化学療法が改良される。

#### 【0076】

あるいは、RAIT療法薬をポリマー複合物よりもむしろ $m\text{ s Ab}$ に付着させることができる。例えば、 $^{90}\text{Y}$ -DOTAに複合化した抗CEA $\times$ 抗DTPA $m\text{ s Ab}$ を、CEA発現腫瘍を有する被験体に最初に投与する。この例では、抗インジウム-DTPA抗体がイットリウム-DOTAキレートに結合しないという点で、一定の抗キレート $m\text{ Ab}$ の選択性が得られるという利点を得られる。 $^{90}\text{Y}$ -DOTA-抗CEA $\times$ 抗インジウム-DTPAが腫瘍で最大になり、その後非標的組織が除去された後、インジウム-DTPA- $\beta$ グルクロニダーゼを含むポリマー複合物が注射され、CEA腫瘍部位に特異的に局在化される。次いで、被験体にポリ $(\text{Glu})(\text{SN}-38)_{10}$ などのポリマー-プロドラッグを注射する。後者は、化学療法を前に投与したRAITと首尾よく組み合わせた単量体SN-38を活性化するために腫瘍で選択的に切断される。

30

#### 【0077】

標的部位に抗原に特異的な少なくとも1つの結合部位および酵素に特異的な少なくとも1つの他の結合部位を含む多特異性抗体または抗体フラグメントを本発明の方法で使用することができることに留意すべきである。このような抗体は、注射前に酵素に結合させることができ、それにより酵素を抗体と共有結合させることが必要であるか、標的部位に注射および局在化することができ、非標的抗体が被験体の循環系から実質的に除去された後、酵素を予備ターゲティング $m\text{ s Ab}$ に到達および結合し、インサイチューで抗体-酵素複合物を形成するのに十分な量および経路で注射することができる。

40

#### 【0078】

ポリマー複合物を、正常組織または罹患組織の同定に有用であり得る標識リガンドとして作用する種々の薬剤に複合化させることもできる。本発明の1つの好ましい実施形態では

50

、ポリマー複合物に複合化させる薬剤は標識リガンドであり、また診断薬という。標識リガンドの例には、放射性同位体、着色剤（ビオチン-ストレプトアビジン複合体など）、造影剤、蛍光化合物もしくは分子、および核磁気共鳴造影法（MRI）の増強剤が含まれるが、これらに限定されない。好ましくは、標識リガンドは、放射性同位体、核磁気共鳴造影法の増強剤、造影剤、および着色剤からなる群から選択される。

#### 【0079】

本発明の1つの実施形態の実施では、ポリマー複合物に複合化された診断薬の投与前に m s A b を投与する。罹患組織に m s A b が標的化するのに十分な時間の経過後、診断薬を投与する。診断薬の投与後、画像化を行うことができる。光が送達される種々の構造を直接または間接的に観察する手段によって体腔中の腫瘍を検出し、その後回収することができる。非電離放射線が送達されてこれらの構造から再捕獲することができる限り、任意の身体部位での病変を観察することができる。例えば、高分解能かつ非侵襲性の画像化技術である陽電子放出断層撮影法（PET）を、ヒト疾患の視覚化のために本発明の抗体と共に使用することができる。PETでは、陽電子消滅崩壊中に得られた 511 keV の  $\gamma$  光子を検出する。 $^{18}$ F フッ素および  $^{68}$  Ga ガリウムを使用した PET のための類似の予備ターゲティング戦略は、それぞれ米国特許第 6,187,284 号および米国特許出願第 09/644,706 号に記載されている。これらの出願に記載の方法を本発明に容易に適用可能であり、その全てが本明細書中で参照して組み込まれる。

#### 【0080】

別の例として、本発明の抗体または抗体フラグメントを、光力学の診断方法または治療方法で 사용할 ことができる。この診断方法では、診断薬を例えば全身に注射し、レーザー誘起蛍光法を使用して、内視鏡によって光活性化薬に融合した癌部位を検出することができる。例えば、これは、初期肺腫瘍の蛍光気管支鏡の開示(Doironら、Chest、76、32、1979)（本明細書中で参照して組み込まれる）に提供されている。別の例では、本発明の抗体および抗体フラグメントを単光子放出で 使用することができる。例えば、Tc-99m 標識診断薬を、m s A b の投与後に被験体に投与することができる。次いで、被験体を  $\gamma$  カメラでスキャンして、単光子放出コンピュータ断層撮影画像を得て、病変または腫瘍部位を定義する。

#### 【0081】

本発明を、光力学治療方法で 使用することもできる。この方法では、光線感作物質（例えば、ジヘマトポルフィリンエーテルなどのヘマトポルフィリン誘導体）を被験体に投与する。例えば、波長 630 nm の強力な赤色の光の使用によって抗腫瘍活性を開始する。皮膚が太陽光によってあまり光感作されない、より長い波長で有用なものを含む別の光線感作物質を使用することができる。このような光感作物質の例には、ベンゾポルフィリン-酸環 A（BPD-MA:benzoporphyrin monoacid ring A）、スズエチオプルプリン（SnET2）、スルホン化アルミニウムフタロシアニン（AlSPc）およびルテチウムテクニサフィリン（Lutex）が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0082】

ポリマー複合物投与のしばらく前に m s A b を投与することができる。当業者は試薬の用量およびタイミングを容易に得ることができ、これは使用される試薬の特定の性質に依存する。m s A b - F (a b')<sub>2</sub> 誘導体を最初に投与する場合、ポリマー複合物投与の待ち時間は 1～6 日間が適切である。IgG-F a b' m s A b 複合物が一次ターゲティングベクターである場合、ポリマー複合物投与前の待ち時間はより長く、好ましくは 3～15 日間の範囲である。多特異性融合タンパク質（例えば、抗CEA F a b × 抗ペプチド s c F v）が一次ターゲティングベクターである場合、ポリマー複合物投与前の待ち時間はより短く、好ましくは 1～5 日間の範囲である。

#### 【0083】

標的部位への薬剤のターゲティング方法はまた、組織から非結合 m s A b を除去するための組織への除去組成物(clearing composition)の投与を含む。m s A b の用量とポリマー複合物の用量との間の除去剤を投与する。本発明者らは、m s A b のターゲティングアー

10

20

30

40

50

ムを認識して結合する、グリコシル化抗イディオタイプ F a b' フラグメントからなる除去剤を発見した。この実施例では、m s A b を投与し、標的部位に融合させる。残存 m s A b を除去するために、グリコシル化 F a b' フラグメントとして、m s A b に対する抗イディオタイプ A b を投与する。除去剤は、1 価の様式で m s A b に結合し、その結合したグリコシル残基は全複合体を肝臓に指向させ、迅速に代謝される。その後ポリマー複合物を被験体に投与する。例えば、抗 C E A ( M N 1 4 A b ) × 抗ペプチド m s A b を組織に投与し、m s A b を最も広い範囲で所望の標的部位に融合させる。残存 m s A b を除去するために、W I 2 と呼ばれる M N - 1 4 に対する抗イディオタイプ A b をグリコシル化 F a b' フラグメントとして投与する。m s A b の M N - 1 4 アームに対する W I 2 A b の親和性は高く、除去機構は他の開示された機構と異なり ( Goodwin ら、前出を参照のこと )、W I 2 - F a b' は 1 価の部分であるので架橋を含まない。

10

#### 【0084】

本発明はまた、被験体の組織または組織サンプル内の標的部位のターゲティングに有用なキットであって、( a ) 該組織内の抗原に結合するターゲティングアームとポリマー複合物に結合する捕捉アームとを含む多特異性抗体または抗体フラグメントと、( b ) 該捕捉アームに結合するポリマー複合物であって、治療薬、ペプチド、酵素、および標識リガンドからなる群から選択される該薬剤に結合したポリマーを含むポリマー複合物とを含むキットを提供する。罹患組織の同定または治療を容易にする装置もまたキット中に含めることができる。例には、シリンジなどの適用デバイスが含まれるが、これらに限定されない。罹患組織の同定または治療用の開示の発明の使用に必要な溶液もキット中に含めることができる。

20

#### 【0085】

好ましい実施形態では、本発明によって提供されるキットのポリマー複合物は、認識ハプテンをさらに含む。

#### 【0086】

好ましい実施形態では、キットの m s A b は、本来モノクローナルまたはポリクローナルであり得るが、モノクローナルが好ましい。さらに、m s A b のターゲティングアームおよび捕捉アームは、本来モノクローナルまたはポリクローナルであり得る。好ましくは、標的アームまたは捕捉アームのいずれかがモノクローナルである。最も好ましくは、標的アームおよび捕捉アームの両方がモノクローナルである。

30

#### 【0087】

別の好ましい実施形態では、キットの m s A b は標識を有するように操作することができる。m s A b が有することができる標識の例には、ビオチン-ストレプトアビジン複合体および放射性同位体などの標識リガンドが含まれるが、これらに限定されない。好ましくは、本発明の m s A b は放射性標識されている。

#### 【0088】

別の好ましい実施形態では、キットの m s A b はキメラ抗体、ヒト化抗体、またはヒト抗体であるが、より好ましくはヒト抗体またはヒト化抗体である。さらに別の好ましい実施形態では、m s A b のターゲティングアームおよび捕捉アームは、キメラ抗体、ヒト抗体、またはヒト化抗体であり得る。好ましくは、標的アームまたは捕捉アームのいずれかはヒト抗体である。最も好ましくは、標的アームおよび捕捉アームの両方がヒト抗体またはヒト化抗体である。

40

#### 【0089】

1 つの好ましい実施形態では、本出願によって提供されたキットはまた、組織から非結合 m s A b を除去する除去組成物を含み得る。除去剤を、m s A b の投与または適用とポリマー複合物の投与または適用との間に投与することが好ましい。

#### 【0090】

別の好ましい実施形態では、本発明のキットは、薬物またはプロドラッグも含み得る。より好ましい実施形態では、キットは、プロドラッグを活性な薬物に変換する酵素と複合化されたポリマー複合物を含む。

50



## 【0091】

本出願の発明は、一般に、疾患の治療または診断のための標的組織のためのmsAb／ポリマー複合物の認識系に関する。したがって、ポリマー複合物およびその化学は、本発明の成功に不可欠である。

## 【0092】

典型的な(exemplary)認識ハプテンを使用して、DTPA、DOTA、HBED、およびHSGなどのカルボキシル含有キレート誘導体を、カルボジイミド様試薬を使用した限定数のカルボン酸基の活性化の制御によってアミノ含有ポリマーと容易にカップリングさせる。イソチオシアネート誘導アナログを使用して、フルオレセインをアミン含有ポリマーと容易にカップリングさせる。同様に、アミノ含有認識ハプテンを、複数の遊離カルボキシル基を有する適切なカルボキシル活性化ポリマーと容易にカップリングさせる。アルデヒド基もしくはケトン基またはヒドラジニル基もしくはアミノ基を有するハプテンを、任意選択的に含まれるシッフ塩基型中間体を還元するための還元工程を使用して相補的機能性を有するポリマーと容易にカップリングさせる。遊離チオールを有するハプテンを、チオエーテルを得るための活性化ハロゲノ中間体のアルキル化、マイケル付加、またはジスルフィド結合形成によってポリマーと容易にカップリングされる。逆に、遊離チオールはポリマー上に存在し、求電子物質はハプテン上に存在し得る。ハプテン上の遊離水酸基を、適切に誘導化されたポリマーから開始するエーテルまたはエステルとして付着することができ、活性水素をマンニッヒ型縮合反応で使用することができる。

## 【0093】

ポリマー複合物およびハプテンの例に関連する上記のいくつかを、本発明で使用するべき薬剤に等しく一般的に適用する。例えば、上記の一部は、SN-38（プロドラッグCPT-11の活性代謝産物（イリノテカン））などの上記の一定の薬物であった。SN-38は、エステラーゼ型酵素に感受性を示すアリールエステルを生成するための上記の説明で使った芳香族水酸基を有する。同様に、化学療法で使われるカンプトセシンアナログであるトポテカンおよび10-ヒドロキシカンプトセシンは共にエステラーゼ感受性ポリマープロドラッグを生成するSN-38と類似の様式で利用可能である芳香族水酸基残基を有する。このクラスでは、タキソールおよび一定のビンカルカロイドを置くこともできる。各例では、遊離水酸基を含む薬物を、エステル結合を使用してポリマーに付着させる。エステル結合使用の好ましい利点は、薬物-ポリマー結合を切断可能であり、細胞内または細胞外に局在する場合のいずれにおいても、遊離および活性薬物を長期間生成して標的部位でその効力を発揮することができることである。ドキソルビシンはまた、カンプトセシンファミリーと類似の酸触媒反応を使用して、カルボン酸含有ポリマー複合物に複合化させることができる水酸基を含む。

## 【0094】

ドキソルビシン、およびポリマー複合物と化学カップリングするのに十分に活性なアミノ「化学結合手」を有する他の薬物を、多数の方法でこれらの遊離アミノ基を介して複合物と有効にカップリングさせることができる。遊離カルボン酸基を有するポリマーを、インサイチュー（EDAC；水溶性カルボジイミド）で活性化することができ、ドキソルビシンと混合された活性化ポリマーは、アミド結合を介してポリマーの側鎖に薬物を直接付着させる。アミノ含有薬物を、エチレングリコビス（スクシニミジルスクシネート）（EGS）（Pierce Chemical Co. Rockford, IL）またはビス-〔2-（スクシニミド-オキシカルボニルオキシ）エチル〕スルホン（BSOCS）（Molecular Biosciences, Huntsville, AL）などの市販の切断可能な架橋剤の混合によってアミノ懸垂ポリマーとカップリングさせて、ビス（スクシニミジル）エステル基との反応後に2つのアミドとして2つのアミンを架橋することもできる。好ましい複合物は、例えば、（ドキソルビシン-EGS）<sub>n</sub>-ポリリジンがエステラーゼなどの酵素によるEGS結合鎖中のジエステル基の酵素切断に感受性を示すまでである複合物である。

## 【0095】

ドキソルビシンの多数のアナログが調製されており、これらの多くを類似の方法でポリマ

10

20

30

40

50

ーとカップリングさせることもできる。これらのアナログの例は、ドキソルビシン自体よりも腫瘍細胞に対して100～1000倍有毒であると報告されている2-ピロリノドキシソルビシン(2-PDOX)である。2-PDOXを使用して、ドキソルビシン中に存在する遊離アミノ基をエナミンに変換した。しかし、2-PDOX分子の他の末端で、ケトン基および水酸基を複合化反応に利用可能である。水酸基を、標準的なエステル化学を使用して活性化ポリグルタミン酸もしくはポリアスパラギン酸ポリマーまたは複数のこれらのサブユニットを含むコポリマーとカップリングさせて、エステル結合薬物-ポリマー複合物を生成することができる。別のアプローチでは、ポリ酸性複合物を標準的なカップリング化学を使用してヒドラジドに部分的に変換し、ヒドラジドをその後ドキソルビシンまたは2-PDOX中のケトン基で縮合することができる。形成したシッフ塩基を還元せずに使用するか、水素化ホウ素ナトリウムまたは水素化シアノホウ素ナトリウムとの短い反応によって還元することができる。

10

#### 【0096】

メトトレキセートなどの他の周知の薬物も、上記のドキソルビシンと類似の様式で活性化カルボン酸含有ポリマーとのカップリングに利用可能なアミノ基を有する。メトトレキセートはまた、アミノ基含有ポリマーとのカップリングのために活性化することができる2つのグルタミルカルボキシル基( $\alpha$ および $\gamma$ )を有する。メトトレキセートの遊離カルボン酸基をインサイチュール(EDTA)で活性化し、アミノ含有ポリマーと混合された活性化した薬物は、アミド結合を介してポリマーの側鎖に薬物を直接付着させることができる。低分子量物質のポリマーへのほとんどの複合化と同様に、過剰な非結合または交差反応した薬物を、サイズ排除クロマトグラフィもしくはイオン交換クロマトグラフィ、または透析もしくはダイアフィルトレーションを使用してポリマー-薬物複合物から容易に分離する。

20

#### 【0097】

メイタンシノイドおよびカリケアミシン(エスペラマイシンなど)を、本発明の範囲内で使用することもできる。後者は、切断して化学的操作に有用な1つのチオールを含む化合物を作製することができる混合したジスルフィドおよびトリスルフィド結合を含む。ポリGlu-Lys-OHなどのコポリマーを、リンカーにポリマーの遊離リジンアミノ基を付加するようにスクシニミジル/マレイミド架橋剤を使用して処理した。これにより、種々の置換比でチオール含有薬物と反応することができるポリマー上の複数のマレイミド残基が得られる。使用した架橋剤を、ペプチダーゼによる切断に感受性を示すように選択することができる。より好ましくは、カリケアミシンなどの薬物を、還元時にこれらが容易に活性化されるようにジスルフィド結合を介してポリマーに結合する。したがって、システインなどのチオール残基を含むコポリマーが意図される。この好ましい実施形態では、抗成長活性を誘導するカリケアミシン反応カスケードを誘発するために必要な還元プロセスは、細胞外環境と対照的に還元性の高い細胞内区画で起こる傾向が強くなるようであることを強調することができる。したがって、認識ハプテン-ポリマー-薬物複合物によって架橋時に誘導的に内在化される多特異性ターゲティング薬が特に好ましい。重要な一般的な問題は、薬物-ポリマー結合が化学結合安定性に関して変化することができ、ポリマー骨格と認識ハプテンとの間の結合が血清分解に対して強力かつ影響を受けないことである。

30

40

#### 【0098】

例えばカルボキシル基を含むクロロ、プロモ、トシル、またはメシルマスタード誘導体を活性エステル、アジド、または酸塩化物中間体を使用してポリマーにカップリングさせることができる一方で、アルキル化部分が本質的にインタクトなままであるので、アルキル化剤として分類される薬物でさえ本発明の範囲内である。あるいは、マスタード剤の前駆体をポリマーにカップリングさせることができ、前駆体をハロゲン化または類似の反応によって活性薬剤に変換することができる。

#### 【0099】

ポリマーまたは認識ハプテンとして使用すべきペプチドは、固相支持体を使用する自動化ペプチド合成機ならびに標準的な反復的直交脱保護およびカップリング技術(standard te

50

chniques of repetitive orthogonal deprotection and coupling)によって都合よく合成される。その後キレート複合化に使用されるペプチド中の遊離アミノ基を、例えばアセチル化によって有機小部分で有利にブロックする。例えば、その集合樹脂から切断したAc-Gly-D-Tyr-D-Trp-Gly-D-Lys(Ac)-Gly-D-Tyr-D-Trp-OHを、活性エステル/無水物法を使用してその1つのカルボキシル部分を介して活性化し、複数の単位でKLHにカップリングさせる。免疫原使用に、ジシステイニル含有ペプチドAc-Cys(Y)-D-Tyr-D-Trp-Gly-D-Cys(Y)-Gly-D-Tyr-D-Trp-OHを、メチル化によって保護されたチオール基を使用して樹脂から除去して、Ac-Cys(Me)-D-Tyr-D-Trp-Gly-D-Cys(Me)-Gly-D-Tyr-D-Trp-OH作製することができる。10

次いで、これを、同一の標準的方法を使用してKLHカップリングを活性化することができる。ペプチドをその後の使用のためにmsAb系内で調製する場合、これらを樹脂から有利に切断して、インビボでカルボキシペプチダーゼ活性を阻害する対応C末端アミドを作製する。

#### 【0100】

次いで、上記考察で個別に記載の成分を、以下の一般的アプローチを使用した被験体の治療に適用する。第1に、至適用量の多特異性抗体を経験的に決定し、mgタンパク質/kgまたは/m<sup>2</sup>被験体の用語で示すことができる。第2に、腫瘍標的に投与される薬物の至適用量が決定されるハプテン-ポリマー-薬物複合物のタイミングおよび用量を、至適用量の多特異性抗体での予備ターゲティング後に再度経験的に決定する。これらなどの至適用量の決定を、薬理学および放射薬理学における標準的技術を使用して容易に行う。一旦基本用量およびタイミングが決定されると、方法をより一般的に適用する用意ができる。

#### 【実施例】

##### 【0101】

本明細書中で引用した全ての引例は、その全体が本明細書中で参照して組み込まれる。

##### 【0102】

##### [実施例1]

[ポリ-ε-グルタミン酸(SN-38-エステル)<sub>10</sub>の調製]

10g(2~6.66×10<sup>-2</sup>モル)のポリ-ε-グルタミン酸(15~50kDa;Sigma Chemical Company)を、200mLの乾燥蒸留ジメチルホルムアミド(DMF)および3.92g(1×10<sup>-2</sup>モル)のSN-38と混合する。塩化水素生成系(塩酸および濃硫酸の穏やかな混合および得られたガスの濃硫酸への通過)により、重量が5g増加するまで乾燥塩化水素ガスをDMFに添加する。混合物を、反応バイアルに戻る前にDMFから水を除去するための乾燥硫酸マグネシウムを充填したソックスレー抽出機を使用して3時間加熱還流する。冷却後、生成物ポリ-ε-グルタミン酸(SN-38-(エステル)<sub>10</sub>)を含むDMFを、DMFに対して10倍過剰のジエチルエーテルで処理する。回収した沈殿物をエーテルで洗浄し、水に入れ、水溶液をクロロホルムで抽出して、残存する遊離SN-38を除去する。凍結乾燥固体としてポリ-ε-グルタミン酸(SN-38-エステル)<sub>10</sub>を回収し、SN-38:ポリマー比を分光光度法で決定する。40

##### 【0103】

##### [実施例2]

[AcLys(HSG)Glu<sub>6</sub>[10-ヒドロキシカンプトセシン]<sub>6</sub>Lys[HSG]NH<sub>2</sub>の調製]

最初の樹脂結合リジンをアリルオキシカルボニルε保護基に置換し、最後の[N末端]リシル残基をそのεアミノ位で同様に保護する標準的な固相合成法を使用して、表題ペプチドを個別の物質として調製する。鎖合成の最後にN末端をアシル化する。ペプチド構築時のtert-ブチルエステルとしてグルタミン酸γカルボキシル基を保護する。Fmocを使用してαアミノ基を保護し、Fmoc脱保護およびカップリングの連続ラウンドを使用して固相上にペプチドを調製する。2つのεAlaOC基を選択的に除去する。部分的に50

保護されたペプチドを、適切なカルボキシル基活性化剤を使用してその遊離カルボキシル基によって過剰のトリチル-HSGと反応させる。最後に、tert-ブチル保護基を、HSG樹脂由来のトリチルと共にリシルからそれぞれ除去し、トリフルオロ酢酸を使用してペプチドを樹脂から切断する。10-ヒドロキシカンプトセシンおよびHSG含有ペプチドと共に触媒およびDean-Stark条件を使用してトルエン中で反応させて、エステルとしてペプチドグルタミン酸 $\gamma$ カルボキシル基に結合した10-ヒドロキシカンプトセシン部分と共にAcLys (HSG) Glu<sub>6</sub> [10-ヒドロキシカンプトセシン]<sub>6</sub> Lys [HSG] NH<sub>2</sub>が生成される。

【0104】

〔実施例3〕

〔グルタミン酸のランダムコポリマーへのドキソルビシンのカップリング〕

ポリ (Glu, Glu-OMe) (4:1) から構成される70~150 kDのランダムコポリマーを、過剰のヒドラジン水和物で処理し、室温で24時間静置する。過剰のヒドラジンを透析の反復によって除去し、pH5でポリ (Gly, Glu-NHNH<sub>2</sub>) を5倍過剰 (評価したヒドラジンに対して) のドキソルビシンと混合する。混合物を一晩攪拌し、過剰なドキソルビシンを透析の反復によって除去する。ドキソルビシンの置換範囲を、分光光度法で決定する。任意選択的に、ドキソルビシンがポリマーに結合したシッフ塩基を、過剰のシアノ水素化ホウ素ナトリウムとの一晩の反応によって還元する。

【0105】

〔実施例4〕

〔メタロチオネイン-DOTAへのカリケアミシンのカップリング〕

DOTA溶液を、1/10のN-ヒドロキシースルホスクシニミドおよび1/100のカルボジイミドカップリング剤EDACとの反応により、利用可能な4つの遊離カルボキシル単位のうちのたった1つを活性化させるために、限られた様式で活性化した。次いで、メタロチオネインサンプルを、pHのリン酸緩衝液に対して透析し、メタロチオネインに対して10倍過剰の活性化DOTAキレート剤溶液で処理する。4℃で一晩カップリング反応を進行させ、1 mMのEDTAを含むpH6の無金属の0.2 M酢酸アンモニウムに対する反復透析によって、メタロチオネイン-DOTAを未反応生成物から精製する。次いで、DOTA-メタロチオネイン複合物を10倍過剰 (遊離チオール基に対して) のカリケアミシンと混合し、4℃で一晩反応させ、pH6の無金属の0.2 M酢酸アンモニウムに対する反復透析によって非結合薬物から精製する。

【0106】

〔実施例5〕

〔DTPA-ポリマー複合物へのアルキル化剤のカップリング〕

2-(ジメチルアミノ)エチルメタクリレート (DMAEMA) とアミノエチルメタクリレートとのランダムコポリマーを、ラジカル開始剤としてのアンモニウムペルオキシ二硫酸 (60℃、16時間) によって生成する。遊離第一級アミノ基を含むp [DMAEMA]-co-AEMA生成物を、水に対する多数の透析によって精製する。これを一定量のDTPA二無水物を含むリン酸緩衝液 (pH8) で処理し、再度水に対して透析して非結合DTPAを除去する。DTPA置換比を、漸増量の<sup>111</sup>In含有冷塩化インジウム溶液中のアリコートの滴定によって評価する。化学療法薬であるクロラムブシルを、等量のジシクロヘキシルカルボジイミドおよびN-ヒドロキシスクシニミドを含む乾燥ジオキサンと混合する。2時間の攪拌後、形成されたジシクロヘキシルウレアを濾過して取り出す。利用可能な遊離アミノ基に対してモル過剰のエステル活性化クロラムブシルのジオキサン溶液を、50%の最終ジオキサン濃度までDTPA-p [DMAEMA]-co-AEMAポリマーを含むリン酸溶液 (pH8) に添加する。30分の反応後、塩酸でpH3に調整し、クロラムブシル-p [DMAEMA]-co-AEMA-DTPAポリマーを、濾過によって不溶性薬物から精製し、酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4) に対する反復透析によって精製する。

【0107】

10

20

30

40

50

## [実施例 6]

## [ポリグルタミン酸ポリマーに対する抗体の開発]

ポリグルタミン酸（平均分子量 15,000）を、1/20 モル（ポリ E に対して）の N-ヒドロキシスルホスクニミドの存在下で 1/20 モルの水溶液カルボジイミド EDC（pH 4）で処理する。室温で 3 時間反応を進行させ、粗混合物を K L H を含むリン酸緩衝液（pH 8）に添加する。生成物を、P B S に対する反復透析によって精製する。これを、最初フロイント完全アジュバントを使用し、その後フロイント不完全アジュバントを使用する免疫担当マウスへの反復注射に使用する。抗体力価に関して免疫応答を測定するために、同一のポリグルタミン酸をより良好なプレート吸着のために非特異性 I g G 分子（キャリアとして）にカップリングさせるか、E L I S A プレート上に直接吸着させることができる。良好な抗体力価を有する多数のマウスを選択し、標準的技術にしたがってこれらの動物由来の脾臓細胞をマウス骨髓腫細胞株 S P 2 / 0 に融合する。ポリグルタミン酸に対する反応性について 3000 個までのクローンを E L I S A でスクリーニングする。ポリグルタミン酸に結合する I g G の分泌で同定されたこれらのクローンをサブクローン化し、正のハイブリッドを選択し、無血清培地での成長に適合させる。標準的な細胞培養法を使用して大量の I g G を生成し、I g G または I g G の F ( a b ' )<sub>2</sub> および F a b ' フラグメントとしてカップリングさせ、以下に詳述した抗 D T P A 抗体と類似の様式で適切なターゲティングベクターにカップリングさせることができる。

10

【0108】

## [実施例 7]

## [ドキシソルビシンに対する抗体の開発]

ドキシソルビシン（54.3 mg、 $1 \times 10^{-4}$  モル）を、2 倍モル過剰の架橋剤ビス [スルホスクニミジル] スベレート（B S<sup>3</sup>; Pierce Chemical Co., Rockford IL, 114.4 mg、 $2 \times 10^{-4}$  モル）と混合する。室温で 30 分間活性化を進行させ、粗混合物を 100 mg のウシ血清アルブミンを含むリン酸緩衝液（pH 8）に添加した。生成物 [ドキシソルビシン]<sub>10</sub>-B S A を P B S に対する反復透析によって精製し、最初フロイント完全アジュバントを使用し、その後フロイント不完全アジュバントを使用する免疫担当マウスへの反復注射に使用する。抗体力価に関してドキシソルビシンに対する免疫応答を測定するために、薬物を非特異的キャリアタンパク質としてのオボアルブミンにカップリングさせ、後者の複合物を血清試験に使用することができる。良好な抗体力価を有する多数のマウスを選択し、標準的技術にしたがってこれらの動物由来の脾臓細胞をマウス骨髓腫細胞株 S P 2 / 0 に融合する。ドキシソルビシン-オボアルブミンに対する反応性について 3000 個までのクローンを E L I S A でスクリーニングする。ドキシソルビシンに結合する I g G の分泌で同定されたこれらのクローンをサブクローン化し、正のハイブリッドを選択し、無血清培地での成長に適合させる。標準的な細胞培養法を使用して大量の抗ドキシソルビシン I g G を生成し、I g G または I g G の F ( a b ' )<sub>2</sub> および F a b ' フラグメントとしてカップリングさせ、以下に詳述した抗 D T P A 抗体と類似の様式で適切なターゲティングベクターにカップリングさせることができる。

20

30

【0109】

## [実施例 8]

## [抗 C E A × 抗 D T P A 二重特異性抗体の調製]

a) I g G へのマレイミド基の導入: 1 mL の h M N - 1 4 I g G (8.45 mg/mL) 溶液の pH を、約 3 μ L の 1 N H C l で pH 7.2 に調整する。これに 10.7 μ L の 10 mM スルホ-S M C C (1.9 倍モル過剰) の水溶液を添加し、反応混合物を室温で 45 分間静置する。0.1 M リン酸ナトリウム (pH 6.5) を使用した Sephadex G50/80 によるサイズ排除クロマトグラフィによって精製する。タンパク質濃度 (A<sub>280</sub>) およびマレイミド含有量を決定する (この条件下で 0.93 マレイミド/I g G が見出された)。後者の決定は、既知の過剰の 2-メルカプトエタノール (2-M E) との反応およびその後のエルマンアッセイによる未消費 2-M E の滴定を含む。

40

【0110】

50

b) 734F (a b')<sub>2</sub> の 734F a b' への還元: 734MAb (1.25 mL; 10 mg) の F (a b')<sub>2</sub> フラグメントを、0.1 mL の 100 mM システインを含む 20 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.3) と混合する。緩衝液はまた、150 mM 塩化ナトリウムおよび 10 mM EDTA を含み、還元ジスルフィド結合の不十分な再酸化を防止するためにアルゴンを通す。反応物を、37℃で50分間インキュベートし、溶出緩衝液として 0.1 M リン酸 / 5 mM EDTA (pH 6.5) を使用した Sephadex G50/80 でのサイズ排除クロマトグラフィによって精製する。

#### 【0111】

c) hMN-14-IgG と 734-F a b' フラグメントとの複合化: 上記反応由来の hMN-14-マレイミドおよび 734F a b' を 1:1 のモル比で混合する。反応混合物をアルゴンで流し、室温で約1時間インキュベートする (異なる反応では50分から1.5時間を首尾よく使用することができる)。反応後、40倍モル過剰の N-エチルマレイミド (2.64 mM 水溶液) を添加し、混合物を 4℃で一晩静置して、F a b' フラグメント上の過剰のチオール基をブロックする。反応混合物を、Sephadex G50/80 および 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.3) によるサイズ排除クロマトグラフィを使用して精製する。

#### 【0112】

d) IgG × F a b' m s A b の精製: カラム (外径 0.9 cm) に 3 mL の Affigel-DTPA ゲルを充填し、これを使用して DTPA 含有物質から非結合 IgG を分離する。上記 c) 由来の粗反応生成物を、0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.3) で予め平衡化した Affigel-DTPA カラムに通過させる。非結合 hMN-14 を、カラムに通す。結合画分を、1 M EDTA (pH 4.0) を使用してアフィニティカラムから溶離し、カラム由来の溶離物を合わせ、速やかにこのプロセスをプールし、0.2 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.8) に対して緩衝液を3回交換して透析する。次いで、サンプルを濃縮し、溶離液として 0.2 M リン酸ナトリウム (pH 6.8) を使用した TSK G3000SW カラムでの分離用サイズ排除 HPLC によって精製する。IgG × F a b' の分子量に対応する単量体の化合物を含む画分をプールおよび濃縮する。このスケールでこの方法を使用して、7.7 mg の複合物が得られる (収率 21.4%)。生成物は、HPLC で1つのピークを示し、MALDI 質量分析での平均分子量は 196803 (エラー率 0.2%) であった。

#### 【0113】

##### [実施例9]

##### [ホルモン-抗体ターゲティング薬の調製]

ソマトスタチンアナログ DTPA-オクトレオチドを、等価のカルボジイミド EDC および N-ヒドロキシスルホスクシニミド (pH 4) でそれぞれ処理する。混合物を2時間攪拌し、抗体 679 IgG (抗 HSG) を含むリン酸緩衝液 (pH 8.5) に対して20倍モル過剰で添加する。4℃で一晩反応させた後、置換 679MAb を、リン酸緩衝化生理食塩水に対する反復透析によって精製する。679MAb に対する DTPA-オクトレオチドの置換比を、MALDI-TOF 質量分析によって決定する。薬剤は、多数のソマトスタチン受容体を発現する腫瘍に対して有用である。

#### 【0114】

##### [実施例10]

##### [CEA 陽性腫瘍を発現する被験体の処置]

CEA 抗原を発現する結腸癌を有する被験体に、100 mg/m<sup>2</sup> 用量の二重特異性抗体 hMN-14 × 734F (a b')<sub>2</sub> × F a b' を投与する。24時間後、被験体に等用量の上記の実施例2の方法を使用して事前に調製した AcLys (DTPA) Glu<sub>6</sub> [SN-38]<sub>6</sub> Lys [DTPA] NH<sub>2</sub> DTPA-ポリマー-薬剤複合物のインジウム複合体を投与する。DTPA-ポリマー-薬物は、m s A b での予備ターゲティングのために腫瘍に選択的に局在化され、高濃度の活性薬 SN-38 が局在化する。遊離の SN-38 が局在化複合物から長時間放出され、腫瘍に対して治療効果を発揮する。

## 【0115】

## [実施例11]

[メタロチオネインー(HSG)<sub>2</sub>の調製]

ヒスタミン-スクシニル-グリシン(HSG)溶液を、等モルのN-ヒドロキシースルホ-スクシニミドおよび等モルのEDC(pH4)の水溶液との4時間の反応によって活性化する。リン酸緩衝液(pH8)に対して予め透析したメタロチオネインサンプルを、メタロチオネインに対して5倍モル過剰の活性化HSG溶液で処理する。4℃で一晩カップリング反応を進行させ、無金属0.2M酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.5)に対する反復透析によって、未反応副産物からメタロチオネインー(HSG)<sub>2</sub>を精製する。次いで、その後の<sup>188</sup>レニウムでの還元放射性標識のために、100倍過剰(スズに対して)のグルコヘ複合プトン酸ナトリウムを含む800mg/mLのスズイオン溶液の作製によってメタロチオネインー(HSG)<sub>2</sub>複合物を混合し、1~10mgの割り当てでバイアルに等分し、ドライアイス上で凍結し、凍結乾燥させ、アルゴンでの真空または半真空下でバイアルをセプタムでシールする。

10

## 【0116】

## [実施例12]

[<sup>188</sup>レニウムでのメタロチオネインー(HSG)<sub>2</sub>の放射性標識]

実施例15に記載のように放射性標識のために<sup>188</sup>レニウムと調製および混合した10mgのメタロチオネインー(HSG)<sub>2</sub>のサンプルを、<sup>188</sup>タングステン/<sup>188</sup>レニウムタンデム生成系から新たに溶離した<sup>188</sup>レニウム放射性核種を含む生理食塩水の2mL画分(100mCi)で再構成する。メタロチオネインー(HSG)<sub>2</sub>と<sup>188</sup>レニウムとの混合物を含む溶液を95℃で30分間加熱し、+7ペルレニウム形態からメタロチオネインー(HSG)<sub>2</sub>ポリペプチドの複数の遊離チオール基によって結合することができる形態に<sup>188</sup>レニウムを還元する。メタロチオネインー(HSG)<sub>2</sub>への<sup>188</sup>レニウムの組み込み率は、90%超である。

20

## 【0117】

## [実施例13]

[bisAbおよび<sup>188</sup>レニウム-メタロチオネインー(HSG)<sub>2</sub>を使用したターゲティング]

結腸特異性抗原p(CSA-p)と呼ばれる抗原を発現する腫瘍を有する患者を、200mgのbisAb Mu9×679 IgG×Fab' [抗CSA-p×抗HSG]で処置する。1週間後、循環に残存するbisAbの量は、5%ID/gに減少し、腫瘍沈殿物中の残存量は高いままであり、上記の実施例16に記載のように調製した<sup>188</sup>レニウム-メタロチオネインー(HSG)<sub>2</sub>で患者を処置する。腫瘍抗原を介して予備ターゲティングしたMu9×679 bisAbによる<sup>188</sup>レニウム-メタロチオネインー(HSG)<sub>2</sub>に対するHSG部分の認識により、治療用<sup>188</sup>レニウム放射性核種を腫瘍部位に特異的に送達させることができる。

30

## 【0118】

## [実施例14]

## [インジウム-DTPA-ポリ(Glu, Tyr) [4:1]の調製]

40

ポリ(Glu, Tyr) [4:1]を含む0.2Mホウ酸ナトリウム緩衝液(pH8.5)溶液を、過剰のDTPA二無水物で処理する。急速な反応により、コポリマーのαアミノ基上のDTPAが置換されるか、添加した無水基が加水分解する。DTPA結合生成物を、水および酢酸アンモニウム緩衝液(pH4.5)に対する反復透析によって低分子量物質から精製する。最終透析の前に、3倍モル過剰の酢酸インジウムをDTPA-ポリ(Glu, Tyr) [4:1]中間体に添加し、最終分析の1時間前に攪拌する。残存した水および緩衝液成分の蒸発および凍結乾燥により、生成物を純粋にする。

## 【0119】

## [実施例15]

[<sup>131</sup>ヨウ素-[インジウム-DTPA]-ポリ(Glu, Tyr) [4:1]の調製]

50

実施例 18 由来のインジウム-DTPA-ポリ (Glu, Tyr) [4:1] 中間体を、0.3Mリン酸緩衝液 (pH6.0) および 200mCi の  $^{131}\text{I}$  放射性核種と共に Iodogen (商標) バイアルに添加した。反応物を室温で 15 分間浸透し、放射性ヨウ化インジウム-DTPA-ポリ (Glu, Tyr) [4:1] を Indogen (商標) バイアルからいかなるさらなる酸化反応も停止させるためにアスコルビン酸が添加された清潔なバイアルに移す。必要に応じて、陰イオン交換カートリッジで未反応  $^{131}\text{I}$  ヨウ素を除去する。生成物  $^{131}\text{I}$  ヨウ素- [インジウム-DTPA] -ポリ (Glu, Tyr) [4:1] を、いつでも使用できる状態にする。

【0120】

【実施例 16】

[bisAb および  $^{131}\text{I}$  ヨウ素- [インジウム-DTPA] -ポリ (Glu, Tyr) [4:1] 使用したターゲティング]

上皮糖タンパク質 (EGP) と呼ばれる抗原を発現する腫瘍を有する患者を、200mg の bisAb RS7×734F (ab')<sub>2</sub>×Fab' [抗EGP×抗インジウム-DTPA] で処置する。4日後、循環中の bisAb の残存量は 5% ID/g 以下に滴下し、一方で腫瘍沈殿物中の残存量は高いままであり、上記の実施例 19 に記載のように調製した 150mCi の  $^{131}\text{I}$  ヨウ素- [インジウム-DTPA] -ポリ (Glu, Tyr) [4:1] で患者を処置する。腫瘍抗原を介して予備ターゲティングした RS7×734 bisAb による  $^{131}\text{I}$  ヨウ素- [インジウム-DTPA] -ポリ (Glu, Tyr) [4:1] に対するインジウム-DTPA 部分の認識により、治療用放射性核種  $^{131}\text{I}$  ヨウ素を腫瘍部位に特異的に送達させることができる。

【0121】

さらなる目的の引例は、以下を含む。

【表 1A】

10

20



Bamias, A., and Epenetos, A.A. Two-step strategies for the diagnosis and treatment of cancer with bioconjugates. *Antibody, Immunoconjugates, Radiopharm.* 1992; 5: 385-395.

Barbet, J., Peltier, P., Bardet, S., Vuillez, JP., Bachelot, I., Denet, S., Olivier, P., Lecia, F., Corcuff, B., Huglo, D., Proye, C., Rouvier, E., Meyer, P., Chatal, J.F. Radioimmunodetection of medullary thyroid carcinoma using indium-111 bivalent hapten and anti-CEA x anti-DTPA-indium bispecific antibody. *J.Nucl.Med.* 1998; 39:1172-1178. 10

Bos, ES., Kuijpers, WHA., Meesters-Winters, M., Pham, DT., deHaan, AS., van Doormalen, Am., Kaspers, F.M., van Boeckel, CAA and Gougeon-Bertrand, F. In vitro evaluation of DNA-DNA hybridization as a two-step approach in radioimmunotherapy of cancer. *Cancer Res.* 1994; 54:3479-3486.

Gautherot, E., Bouhou, J., LeDoussal, J-M., Manetti, C., Martin, M., Rouvier, E., Barbet, J. Therapy for colon carcinoma xenografts with bi-specific antibody-targeted, iodine-131-labeled bivalent hapten. *Cancer suppl.* 1997; 80: 2618-2623. 20

Gautherot, E., Bouhou, J., Loucif, E., Manetti, C., Martin, M., LeDoussal, J.M., Rouvier, E., Barbet, J. Radioimmunotherapy of LS174T colon carcinoma in nude mice using an iodine-131-labeled bivalent hapten combined with an anti-CEA x anti-indium-DTPA bi-specific antibody. *J.Nucl. Med. Suppl.* 1997; 38: 7p.

Goodwin, D.A., Meares, CF., McCall, MJ., McTigue, M., Chaovapong, W. Pre-targeted immunoscintigraphy of murine tumors with indium-111-labeled bifunctional haptens. *J.Nucl.Med.* 1988; 29:226-234. 30

Greenwood, F.C. and Hunter, W.M. The preparation of I-131 labeled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem.* 1963; 89:114-123.

Hawkins, G.A., McCabe, R.P., Kim, C.-H., Subramanian, R., Bredehorst, R., McCullers, G.A., Vogel, C.-W., Hanna, M.G.Jr., and Pomata, N. Delivery of radionuclides to pretargeted monoclonal antibodies using dihydrofolate reductase and methotrexate in an affinity system. *Cancer Res.* 1993; 53: 2368-2373. 40

Kranenborg, M.h., Boerman, O.C., Oosterwijk-Wakka, j., weijert, M., Corstens, F., Oosterwijk, E. Development and characterization of anti-renal cell carcinoma x

antichelate bi-specific monoclonal antibodies for two-phase targeting of renal cell carcinoma. *Cancer Res.*(suppl) 1995; 55: 5864s-5867s

Penefsky, H.S. A centrifuged column procedure for the measurement of ligand binding by beef heart F1. Part G. *Methods Enzymol.* 1979; 56:527-530.

Schuhmacher, J., Klivenyi, G., Matys, R., Stadler, M., Regiert, T., Hauser, H., Doll, J., Maier-Borst, W., Zoller, M. Multistep tumor targeting in nude mice using bi-specific antibodies and a gallium chelate suitable for immunocintigraphy with positron emission tomography. *Cancer Res.* 1995; 55, 115-123.

10

Sharkey, R.M., Karacay, Griffiths, G.L., Behr, T.M., Blumenthal, R.D., Mattes, M.J., Hansen, H.J., Goldenberg. Development of a streptavidin-anti-carcinoembryonic antigen antibody, radiolabeled biotin pretargeting method for radioimmunotherapy of colorectal cancer. Studies in a human colon cancer xenograft model. *Bioconjugate Chem* 1997; 8:595-604.

20

Stickney, D.R., Anderson, L.D., Slater, J.B., Ahlem, C.N., Kirk, G.A., Schweighardt, S.A. and Frincke, J.M. Bifunctional antibody: a binary radiopharmaceutical delivery system for imaging colorectal carcinoma. *Cancer Res.* 1991;51: 6650-6655.

## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
13 February 2003 (13.02.2003)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 03/011342 A2

- (51) International Patent Classification: A61K 47/48, 51/70, 51/02
- (21) International Application Number: PCT/GB02/03494
- (22) International Filing Date: 31 July 2002 (31.07.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 00/308,446 31 July 2001 (31.07.2001) US
- (71) Applicant: IMMUNOMEDICS, INC. (US/18); 300 American Road, Morris Plains, NJ 07950 (US)
- (71) Applicant *for GB, MG only*: MCCALL, John, Douglas (GB/18); 25 Hadden Drive, Pen-ty, Wima (CH16: XT) (GB)
- (72) Inventor: GRIFFITHS, Gary, L.; 36 Edgchill Avenue, Montislow, NJ 07960 (US)
- (74) Agent: W.P. THOMPSON & CO.; Coopers Building, Church Street, Liverpool L1 3AB (GB)
- (81) Designated States (*national*): AF, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KH, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, NG, SN, TD, TG).
- Published: — without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 03/011342 A2

(54) Title: POLYMERIC DELIVERY SYSTEMS

(57) Abstract: The present invention relates to a method of targeting an agent towards a targeting site in a device comprising administering a multi-specific antibody or antibody fragment comprising a targeting arm and a capture arm that binds to a polymer conjugate, and administering a polymer conjugate to the tissue. The present invention also relates to a kit for targeting a target site within a comprising a multi-specific antibody or antibody fragment comprising a targeting arm and a capture arm that binds to a polymer conjugate, and a polymer conjugate.

WO 03/011342

PCT/GB02/03494

**POLYMERIC DELIVERY SYSTEMS****Background of the Invention****Field of the Invention**

The present invention relates to a method of targeting an agent towards a targeting site in a tissue comprising administering a multi-specific antibody or antibody fragment comprising a targeting arm and a capture arm that binds to a polymer conjugate, and administering a polymer conjugate to the tissue. The present invention also relates to a kit for targeting a target site within a tissue comprising a multi-specific antibody or antibody fragment comprising a targeting arm and a capture arm that binds to a polymer conjugate, and a polymer conjugate.

**Related Art**

Among the current approaches in anti-cancer therapy that seek to improve therapeutic outcomes is the attachment of drugs to long-circulating polymers. Long-circulating polymers extend the half-life of the drug, prodrug or therapeutic agent in the blood, and generally allow for a greater proportion of the agent to reach the tumor site. Additionally, the tumor microenvironment enables macromolecules, including polymers, to accrete preferentially, allowing more of the therapeutic agent to reach the targeted site.

However, with increased half-life may come increased toxicity from the drug that is appended to the polymer, resulting in increased side effects that may negatively impact chemotherapy. Additionally, the longer-circulating polymer may itself elicit an immune response from the patient such that the polymer and the drug to which it is attached are bound by naturally occurring antibodies, and become ineffective.

To overcome these and other problems associated with polymer-drug conjugate therapy, the current invention relates to a method of further increasing the amount of drug-polymer conjugate that can be localized and retained at a tumor site. The method depends on the pre-injection of a multi-specific targeting agent, such as a multi-specific antibody, that has one arm directed against the cancer, and one arm

WO 03/011342

PCT/GB02/03494

directed against a hapten. Typically, agents useful in the current invention have a general formula comprising a (recognition hapten)<sub>n</sub>-(polymer backbone)-(drug or prodrug therapy moiety)<sub>m</sub>, or a polymer backbone-(drug or prodrug therapy moiety)<sub>m</sub>, wherein n and m are integers reflecting different substitution levels on the polymer backbone for the respective species. The polymer-drug conjugate is used after the cancer has been pre-targeted with a multi-specific antibody. In the former case, one arm recognizes the hapten. In the latter case, one arm of the bispecific is directed against some or all of the polymer backbone, or some or all of the appended drug.

The methods disclosed herein may be used for therapeutic or diagnostic purposes. Additionally, a system where the multi-specific antibody recognizes a polymer conjugate will be extremely versatile in a wide array of applications as will be apparent from the description that follows.

#### Summary of the Invention

The present invention relates to a method for targeting an agent towards a target site in a tissue, comprising

- (a) administering to a tissue a multi-specific antibody (msAb) or multi-specific antibody fragment, comprising a targeting arm that binds to an antigen on the target site, and a capture arm that binds to a polymer conjugate; and
- (b) administering to the tissue a polymer conjugate that binds to the capture arm, with the polymer conjugate comprising a polymer conjugated to an agent selected from the group consisting of a therapeutic agent, a peptide, an enzyme and a labeled ligand.

The present invention also relates to a kit, useful for targeting a target site in a tissue or tissue sample, comprising,

- (a) a multi-specific antibody or antibody fragment comprising a targeting arm that binds to an antigen on said target site, and a capture arm that binds to a polymer conjugate or hapten-polymer conjugate; and
- (b) a polymer conjugate that binds to the capture arm, with the polymer conjugate comprising a polymer conjugated to an agent selected from the group consisting of a therapeutic agent, a peptide, an enzyme and a labeled ligand.

WO 03/011342

PCT/GB02/03494

**Brief Description of the Drawings**

N/A

**Detailed Description of Preferred Embodiments**

The current invention relates to a method for targeting an agent towards a target site in a tissue, comprising (a) administering to the tissue a multi-specific antibody (mAb) or multi-specific antibody fragment, comprising a targeting arm that binds to an antigen on said target site, and a capture arm that binds to a polymer conjugate; and (b) administering to the tissue a polymer conjugate that binds to the capture arm, the polymer conjugate comprising a polymer conjugated to the agent selected from the group consisting of a therapeutic agent, a peptide, an enzyme and a labeled ligand. Preferably, the polymer conjugate of the current invention has the general formula (polymer-backbone)-(agent)<sub>m</sub>, where m is an integer, including 0.

As used herein, the term tissue is used to mean a tissue as one of ordinary skill in the art would understand it to mean. As envisioned in the current application, tissue is also used to mean individual or groups of cells, or cell cultures, of a bodily tissue or fluid (e.g. blood cells). Furthermore, the tissue may be within a subject, or biopsied or removed from a subject. The tissue may also be a whole or any portion of a bodily organ. Additionally, the tissue may be "fresh" in that the tissue would be recently removed from a subject without any preservation steps between the excision and the methods of the current invention. The tissue may also have been preserved by such standard tissue preparation techniques including, but not limited to, freezing, quick freezing, paraffin embedding and tissue fixation, prior to application of the methods of the current invention.

As used herein, the terms patient or subject are used interchangeably and are used to mean any animal, preferably a mammal, including humans and non-human primates.

As used herein, the term target site is used to mean a site at the locus of the tissue towards which any type of agent or compound may be directed. Locus can be used to mean any portion of the tissue or cells itself, including normal and/or pathogenic portions. Locus can also mean the area that surrounds the tissue that may

WO 03/011342

PCT/GB02/03494

contain a causal or symptomatic agent of the diseased tissue. The target site may be the entire tissue, or may be a portion of the tissue, such as blood vessels within a tumor, or may be individual or groups of cells, *in vivo* or *in vitro*, or *in situ*, that make up the tissue. It also can be a molecule or molecular subunit that accretes at the locus of the target tissue. Additionally, the target site can be associated with a pathogen in proximity to a diseased tissue, thus the target site does not necessarily have to be directly contacting or integrated with the cell or tissue. The phrases targeted site and targeted tissue are used interchangeably herein.

The current invention utilizes multi-specific antibodies (msAbs) to direct the polymer conjugate to a target site within a tissue. As used herein, multi-specific antibodies have more than one specificity, or more than one valency, such that the msAbs of the invention bind to or recognize more than one antigen or epitope. For example, a bi-specific antibody of the current invention would include an antibody where each arm of the immunoglobulin recognizes or binds to a separate epitope or hapten. Multi-specific antibodies of the current invention also encompass specificities higher than bi-specific, such as, but not limited to, tri-specific or tetra-specific antibodies. For example, tri-specific antibodies may comprise an antibody with two arms directed towards two different cellular antigens, and a third arm directed towards a hapten or drug. As used herein, multi-specific antibodies also include antibodies with more than one valency. For example, an antibody encompassed in the current invention may be comprised of two arms directed towards a single cellular epitope, and a third arm directed towards a hapten or drug, such that the antibody is bi-specific, yet tri-valent. Furthermore, the target arm or arms of the msAb may be directed to two or more distinct epitopes on the target tissue, and the capture arm or arms may be directed to two or more distinct haptens on the polymer conjugate.

As the current invention contemplates, msAbs encompass antibodies multi-specific antibody fragments. The antibody fragments are antigen binding portions of an antibody, such as F(ab')<sub>2</sub>, F(ab)<sub>2</sub>, Fab', Fab, and the like. The antibody fragments bind to the same antigen that is recognized by the intact antibody. For example, an anti-CD22 monoclonal antibody fragment binds to an epitope of CD22. The msAbs of the present invention include, but are not limited to, IgG x IgG, IgG x F(ab')<sub>2</sub>, IgG x Fab',

WO 03/011342

PCT/GB02/03494

IgG x scFv, F(ab')<sub>2</sub> x F(ab')<sub>2</sub>, Fab' x F(ab')<sub>2</sub>, Fab' x Fab', Fab' x scFv and scFv x scFv bi-specific monoclonal antibodies (bismAbs). Also, species such as scFv x IgG x scFv and Fab' x IgG x Fab', scFv x F(ab')<sub>2</sub> x scFv and Fab' x F(ab')<sub>2</sub> x Fab' are included. Most preferably, site-specific attachment sites on the IgG or F(ab')<sub>2</sub> of one or both monoclonal antibodies (mAbs) can be utilized, such as an engineered carbohydrate or an engineered or liberated free thiol group. Since these mAbs are dimeric they can be coupled with two moles of the second mAb. For instance, a mAb directed towards carcinoembryonic antigen (CEA), anti-CEA F(ab')<sub>2</sub>, having an engineered light-chain carbohydrate can be oxidized and converted using a hydrazide-maleimide cross-linker to a derivatized anti-CEA F(ab')<sub>2</sub> having at least one pendant maleimide group per each light chain. This species is coupled to an anti-chelate Fab'-SH at a 1:2 molar ratio, at least, such that an anti-chelate-Fab' x anti-CEA-F(ab')<sub>2</sub>-anti-chelate Fab' conjugate is produced. The resultant msAb is bivalent with respect to the target tissue and the polymer conjugate. It is further understood that the use of the term "msAb" in the present disclosure encompasses multi-specific antibodies and multi-specific antibody fragments.

The term "antibody fragment" also includes any synthetic or genetically engineered protein that acts like an antibody by binding to a specific antigen to form a complex. For example, antibody fragments include isolated fragments, "Fv" fragments, consisting of the variable regions of the heavy and light chains, recombinant single chain polypeptide molecules in which light and heavy chain variable regions are connected by a peptide linker ("scFv proteins"), and minimal recognition units consisting of the amino acid residues or related peptides that mimic the hypervariable region.

The msAbs of the current invention may be monoclonal or polyclonal in nature, but preferably monoclonal. Furthermore, the targeting arm and the capture arm of the msAb may be monoclonal or polyclonal in nature. Preferably, either the target arm or the capture arm is monoclonal. Most preferably, the target arm and the capture arm are both monoclonal.

The msAb of the current invention may be engineered to possess a label. Examples of labels that the msAb may possess include, but are not limited to, a labeling ligand such as the biotin-streptavidin complex and radioisotopes.



WO 03/011342

PCT/GB02/03494

Advantageously, the mAb of the current invention is radiolabeled to facilitate tracking of localization and clearance.

One or both of the targeting arm and the capture arm of the mAb may be chimeric, human or humanized.

5 As used herein, "targeting arm" is used to mean the portion of the mAb that recognizes and/or binds to an antigen present at the locus of the targeted tissue. The antigen may be attached externally to a cell or tissue, or part of the cell-surface membrane, or may be a glycosyl-phosphatidylinositol (GPI)-anchored protein or may be internal to a cell. Additionally, the antigen may be associated with fluids including, but  
10 not limited to, any part of whole blood, lymphatic fluid or cerebrospinal fluid. Furthermore, the antigen may be present in, accreted by or secreted or released by normal, abnormal, diseased or necrotic cells or tissue. Additionally, the antigen may be present on pathogens, including, but not limited to viruses, bacteria and/or prions that are located at the locus of the targeted tissue. Thus the antigen does not necessarily have  
15 to be directly contacting or integrated with the cell. The antigen may have specific characteristics, such as a distinct cell-surface-associated antigen, or it may have general characteristics that are shared by more than one tissue or cell type. For example,  $\beta 1$ -integrin is an extracellular cell adhesion molecule shared by a variety of normal or diseased tissue that is antigenic and would be considered an antigen at the  
20 locus of a target site within the context of the current invention. Examples of antigens include, but are not limited to, MHC complex components, receptors and tumor antigens. Specifically, such antigens include carcinoembryonic antigen (CEA), 17-1A, colon-specific antigen P, epithelial glycoprotein, HER-2/*neu*, epidermal growth factor receptor, CD19, CD20, CD22 and CD74.

25 As used herein, the "capture arm" is used to mean the portion of the mAb that recognizes and binds to the polymer conjugate. The capture arm may recognize the polymeric backbone of the polymer conjugate directly, or the agent conjugated to the polymer backbone, or a hapten bound to the polymer-drug conjugate.

Antibodies to polymer backbones comprised of, for example, peptides, are  
30 generated by well-known methods for Ab production. For example, injection of an immunogen, such as (peptide)<sub>n</sub>-KLH (*n*=1-30) in complete Freund's adjuvant,

WO 03/011342

PCT/GB02/03494

followed by two subsequent injections of the same immunogen suspended in incomplete Freund's adjuvant into immunocompetent animals, is followed three days after an i.v. boost of antigen, by spleen cell harvesting. Harvested spleen cells are then fused with Sp2/0-Ag14 myeloma cells and culture supernatants of the resulting  
 5 clones analyzed for anti-peptide reactivity using a direct-binding ELISA. Fine specificity of generated Abs can be analyzed for by using peptide fragments of the original immunogen. These fragments can be prepared readily using an automated peptide synthesizer. For Ab production, enzyme-deficient hybridomas are isolated to enable selection of fused cell lines. This technique also can be used to raise  
 10 antibodies to one or more of the chelates comprising the polymer conjugate, e.g., In(III)-DTPA chelates. Monoclonal mouse antibodies to an In(III)-di-DTPA are known in the art, for example U.S.P.N. 5,256,395.

After the initial raising of antibodies to the immunogen, the antibodies can be sequenced and subsequently prepared by recombinant techniques. Humanization and  
 15 chimerization of murine antibodies and antibody fragments are well known to those skilled in the art. For example, humanized monoclonal antibodies are produced by transferring mouse complementary determining regions from heavy and light variable chains of the mouse immunoglobulin into a human variable domain, and then, substituting human residues in the framework regions of the murine counterparts. The  
 20 use of antibody components derived from humanized monoclonal antibodies obviates potential problems associated with the immunogenicity of murine constant regions. General techniques for cloning murine immunoglobulin variable domains are described, for example, by the publication of Orlandi *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86: 3833 (1989), which is incorporated by reference in its entirety. Techniques for producing  
 25 humanized mAbs are described, for example, by Jones *et al.*, *Nature* 321: 522 (1986), Riechmann *et al.*, *Nature* 332: 323 (1988), Verhoeven *et al.*, *Science* 239: 1534 (1988), Carter *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 89: 4285 (1992), Sandhu, *Crit. Rev. Biotech.* 12: 437 (1992), and Singer *et al.*, *J. Immun.* 150: 2844 (1993), each of which is hereby incorporated by reference.

30 Alternatively, fully human antibodies can be obtained from transgenic non-human animals. See, e.g., Mendez *et al.*, *Nature Genetics*, 15: 146-156 (1997); U.S.

WO 03/011342

PCT/GB02/03494

Patent No. 5,633,425. For example, human antibodies can be recovered from transgenic mice possessing human immunoglobulin loci. The mouse humoral immune system is humanized by inactivating the endogenous immunoglobulin genes and introducing human immunoglobulin loci. The human immunoglobulin loci are exceedingly  
 5 complex and comprise a large number of discrete segments which together occupy almost 0.2% of the human genome. To ensure that transgenic mice are capable of producing adequate repertoires of antibodies, large portions of human heavy- and light-chain loci must be introduced into the mouse genome. This is accomplished in a stepwise process beginning with the formation of yeast artificial chromosomes (YACs)  
 10 containing either human heavy- or light-chain immunoglobulin loci in germline configuration. Since each insert is approximately 1 Mb in size, YAC construction requires homologous recombination of overlapping fragments of the immunoglobulin loci. The two YACs, one containing the heavy-chain loci and one containing the light-chain loci, are introduced separately into mice via fusion of YAC-containing yeast  
 15 spheroblasts with mouse embryonic stem cells. Embryonic stem cell clones are then microinjected into mouse blastocysts. Resulting chimeric males are screened for their ability to transmit the YAC through their germline and are bred with mice deficient in murine antibody production. Breeding the two transgenic strains, one containing the human heavy-chain loci and the other containing the human light-chain loci, creates  
 20 progeny which produce human antibodies in response to immunization.

Uncarranged human immunoglobulin genes also can be introduced into mouse embryonic stem cells via microcell-mediated chromosome transfer (MMCT). See, e.g., Tomizuka *et al.*, *Nature Genetics*, 16: 133 (1997). In this methodology microcells containing human chromosomes are fused with mouse embryonic stem cells.  
 25 Transferred chromosomes are stably retained, and adult chimeras exhibit proper tissue-specific expression.

As an alternative, an antibody or antibody fragment of the present invention may be derived from human antibody fragments isolated from a combinatorial immunoglobulin library. See, e.g., Barbas *et al.*, *METHODS: A Companion to Methods in Enzymology* 2: 119 (1991), and Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.* 12: 433 (1994),  
 30 which are incorporated by reference. Many of the difficulties associated with generating

WO 03/011342

PCT/GB02/03494

- monoclonal antibodies by B-cell immortalization can be overcome by engineering and expressing antibody fragments in *E. coli*, using phage display. To ensure the recovery of high affinity, monoclonal antibodies a combinatorial immunoglobulin library must contain a large repertoire size. A typical strategy utilizes mRNA obtained from
- 5 lymphocytes or spleen cells of immunized mice to synthesize cDNA using reverse transcriptase. The heavy- and light-chain genes are amplified separately by PCR and ligated into phage cloning vectors. Two different libraries are produced, one containing the heavy-chain genes and one containing the light-chain genes. Phage DNA is isolated
- 10 from each library, and the heavy- and light-chain sequences are ligated together and packaged to form a combinatorial library. Each phage contains a random pair of heavy- and light-chain cDNAs and upon infection of *E. coli* directs the expression of the antibody chains in infected cells. To identify an antibody that recognizes the antigen of interest, the phage library is plated, and the antibody molecules present in the plaques are transferred to filters. The filters are incubated with radioactively labeled antigen and
- 15 then washed to remove excess unbound ligand. A radioactive spot on the autoradiogram identifies a plaque that contains an antibody that binds the antigen. Cloning and expression vectors that are useful for producing a human immunoglobulin phage library can be obtained, for example, from STRATAGENE Cloning Systems (La Jolla, CA).
- A similar strategy can be employed to obtain high-affinity scFv. See, e.g.,
- 20 Vaughn *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 14: 309-314 (1996). An scFv library with a large repertoire can be constructed by isolating V-genes from non-immunized human donors using PCR primers corresponding to all known V heavy-chain ( $V_H$ ) and V light-chains ( $V_\kappa$  and  $V_\lambda$ ) gene families. Following amplification, the  $V_\kappa$  and  $V_\lambda$  pools are combined to form one pool. These fragments are ligated into a phagemid vector. The scFv linker,
- 25 (Gly<sub>4</sub>-Ser<sub>1</sub>), is then ligated into the phagemid upstream of the V light-chain ( $V_L$ ) fragment. The  $V_H$  and linker- $V_L$  fragments are amplified and assembled on the  $I_H$  region. The resulting  $V_H$ -linker- $V_L$  fragments are ligated into a phagemid vector. The phagemid library can be panned using filters, as described above, or using immunotubes (Nunc; Maxisorp). Similar results can be achieved by constructing a combinatorial
- 30 immunoglobulin library from lymphocytes or spleen cells of immunized rabbits and by expressing the scFv constructs in *P. pastoris*. See, e.g., Ridder *et al.*, *Biotechnology*, 13:

WO 03/011342

PCT/GB02/03494

255-260 (1995). Additionally, following isolation of an appropriate scFv, antibody fragments with higher binding affinities and slower dissociation rates can be obtained through affinity maturation processes such as CDR3 mutagenesis and chain shuffling. See, e.g., Jackson *et al.*, *Br. J. Cancer*, 78: 181-188 (1998); Osbourn *et al.*,

5 *Immunotechnology*, 2: 181-196 (1996).

The mAb can be prepared by techniques known in the art, for example, an anti-CEA tumor Ab and an anti-peptide Ab are both separately digested with pepsin to their respective F(ab')<sub>2</sub>s. The anti-CEA-Ab-F(ab')<sub>2</sub> is reduced with cysteine to generate Fab' monomeric units which are further reacted with a cross-linker such as bis(maleimido) hexane to produce Fab'-maleimide moieties. The anti-peptide Ab-F(ab')<sub>2</sub> is reduced with cysteine and the purified, recovered anti-peptide Fab'-SH reacted with the anti-CEA-Fab'-maleimide to generate the Fab' x Fab' bi-specific Ab. Alternatively, the anti-peptide Fab'-SH fragment may be coupled with the anti-CEA F(ab')<sub>2</sub> to generate a F(ab')<sub>2</sub> x Fab' construct, or with anti-CEA IgG to generate an IgG x Fab' bi-specific construct. In one embodiment, the IgG x Fab' construct can be prepared in a site-specific manner by attaching the anti-peptide Fab' thiol group to anti-CEA IgG heavy-chain carbohydrate which has been periodate-oxidized, and subsequently activated by reaction with a commercially available hydrazide-maleimide cross-linker. The component Abs used can be chimerized or humanized by known techniques. A chimeric antibody is a recombinant protein that contains the variable domains and complementary determining regions derived from a rodent antibody, while the remainder of the antibody molecule is derived from a human antibody. Humanized antibodies are recombinant proteins in which murine complementarity determining regions of a monoclonal antibody have been transferred from heavy and light variable chains of the murine immunoglobulin into a human variable domain.

A variety of recombinant methods can be used to produce multi-specific antibodies and antibody fragments. For example, multi-specific antibodies and antibody fragments can be produced in the milk of transgenic livestock. See, e.g., Colman, A., 30. *Biochem. Soc. Symp.*, 63: 141-147, 1998; and U.S.P.N. 5,827,690. Two DNA constructs are prepared which contain, respectively, DNA segments encoding paired

WO 03/011342

PCT/GB02/03494

immunoglobulin heavy and light chains. The fragments are cloned into expression vectors which contain a promoter sequence that is preferentially expressed in mammary epithelial cells. Examples include, but are not limited to, promoters from rabbit, cow and sheep casein genes, the cow  $\alpha$ -lactoglobulin gene, the sheep  $\beta$ -lactoglobulin gene and the mouse whey acid protein gene. Preferably, the inserted fragment is flanked on its 3' side by cognate genomic sequences from a mammary-specific gene. This provides a polyadenylation site and transcript-stabilizing sequences. The expression cassettes are coinjected into the pronuclei of fertilized, mammalian eggs, which are then implanted into the uterus of a recipient female and allowed to gestate. After birth, the progeny are screened for the presence of both transgenes by Southern analysis. For the antibody to be present, both heavy and light chain genes must be expressed concurrently in the same cell. Milk from transgenic females is analyzed for the presence and functionality of the antibody or antibody fragment using standard immunological methods known in the art. The antibody can be purified from the milk using standard methods known in the art.

A chimeric Ab is constructed by ligating the cDNA fragment encoding the mouse light variable and heavy variable domains to fragment encoding the C domains from a human antibody. Because the C domains do not contribute to antigen binding, the chimeric antibody will retain the same antigen specificity as the original mouse Ab but will be closer to human antibodies in sequence. Chimeric Abs still contain some mouse sequences, however, and may still be immunogenic. A humanized Ab contains only those mouse amino acids necessary to recognize the antigen. This product is constructed by building into a human antibody framework the amino acids from mouse complementarity determining regions.

Other recent methods for producing mAbs include engineered recombinant Abs which have additional cysteine residues so that they crosslink more strongly than the more common immunoglobulin isotypes. See, e.g., FitzGerald *et al.*, Protein Eng. 10(10):1221-1225, 1997. Another approach is to engineer recombinant fusion proteins linking two or more different single-chain antibody or antibody fragment segments with the needed dual specificities. See, e.g., Coloma *et al.*, *Nature Biotech.* 15:159-163, 1997. A variety of multi-specific fusion proteins can be produced using molecular

WO 03/011342

PCT/GB02/03494

engineering. In one form, the multi-specific fusion protein is monovalent, consisting of, for example, a scFv with a single binding site for one antigen and a Fab fragment with a single binding site for a second antigen. In another form, the multi-specific fusion protein is divalent, consisting of, for example, an IgG with two binding sites for one antigen and two scFv with two binding sites for a second antigen.

Functional multi-specific single-chain antibodies (mAb), also called diabodies, can be produced in mammalian cells using recombinant methods. See, e.g., Mack *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92: 7021-7025, 1995. For example, mAb are produced by joining two single-chain Fv fragments via a glycine-serine linker using recombinant methods. The V light-chain (V<sub>L</sub>) and V heavy-chain (V<sub>H</sub>) domains of two antibodies of interest are isolated using standard PCR methods. The V<sub>L</sub> and V<sub>H</sub> cDNA's obtained from each hybridoma are then joined to form a single-chain fragment in a two-step fusion PCR. The first PCR step introduces the (Gly<sub>4</sub>-Ser)<sub>3</sub> linker, and the second step joins the V<sub>L</sub> and V<sub>H</sub> amplicons. Each single chain molecule is then cloned into a bacterial expression vector. Following amplification, one of the single-chain molecules is excised and sub-cloned into the other vector, containing the second single-chain molecule of interest. The resulting mAb fragment is subcloned into an eukaryotic expression vector. Functional protein expression can be obtained by transfecting the vector into chinese hamster ovary cells. Multi-specific fusion proteins are prepared in a similar manner. Multi-specific single-chain antibodies and multi-specific fusion proteins are included within the scope of the present invention.

Multi-specific fusion proteins linking two or more different single-chain antibodies or antibody fragments are produced in similar manner as discussed above. Recombinant methods can be used to produce a variety of fusion proteins. For example a fusion protein comprising a Fab fragment derived from a humanized monoclonal anti-CEA antibody and a scFv derived from a murine anti-diDTPA can be produced. A flexible linker, such as (GGGS)<sub>3</sub>, which is a trimer of glycyl-glycyl-glycyl-serine connects the scFv to the constant region of the heavy chain of the anti-CEA antibody. Alternatively, the scFv can be connected to the constant region of the light chain of hMN-14. Appropriate linker sequences necessary for the in-frame

WO 03/011342

PCT/GB02/03494

connection of the heavy chain Fd to the scFv are introduced into the V<sub>L</sub> and V<sub>H</sub> domains through PCR reactions. The DNA fragment encoding the scFv is then ligated into a staging vector containing a DNA sequence encoding the CH1 domain. The resulting scFv-CH1 construct is excised and ligated into a vector containing a DNA sequence encoding the VH region of an anti-CEA antibody. The resulting vector can be used to transfect mammalian cells for the expression of the multi-specific fusion protein.

Large quantities of bscAb and fusion proteins can be produced using *Escherichia coli* expression systems. See, e.g., Zhenping *et al.*, *Biotechnology*, 14: 192-196, 1996. A functional bscAb can be produced by the coexpression in *E. coli* of two "cross-over" scFv fragments in which the V<sub>L</sub> and V<sub>H</sub> domains for the two fragments are present on different polypeptide chains. The V<sub>L</sub> and V<sub>H</sub> domains of two antibodies of interest are isolated using standard PCR methods. The cDNA's are then ligated into a bacterial expression vector such that C-terminus of the V<sub>L</sub> domain of the first antibody of interest is ligated via a linker to the N-terminus of the V<sub>H</sub> domain of the second antibody. Similarly, the C-terminus of the V<sub>L</sub> domain of the second antibody of interest is ligated via a linker to the N-terminus of the V<sub>H</sub> domain of the first antibody. The resulting dicistronic operon is placed under transcriptional control of a strong promoter, e.g., the *E. coli* alkaline phosphatase promoter which is inducible by phosphate starvation. Alternatively, single-chain fusion constructs have successfully been expressed in *E. coli* using the *lac* promoter and a medium consisting of 2% glycine and 1% Triton X-100. See, e.g., Yang *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 2869-2874, 1998. An *E. coli*, heat-stable, enterotoxin II signal sequence is used to direct the peptides to the periplasmic space. After secretion, the two peptide chains associate to form a non-covalent heterodimer which possesses both antigen binding specificities. The bscAb is purified using standard procedures known in the art, e.g., Staphylococcal protein A chromatography.

Functional bscAb and fusion proteins also can be produced in the milk of transgenic livestock. See, e.g., Colman, A., *Biochem. Soc. Symp.*, 63: 141-147, 1998; U.S. Patent #5,827,690. The bscAb fragment, obtained as described above, is cloned into an expression vector containing a promoter sequence that is preferentially



WO 03/011342

PCT/GB02/03494

expressed in mammary epithelial cells. Examples include, but are not limited to, promoters from rabbit, cow and sheep casein genes, the cow  $\alpha$ -lactoglobulin gene, the sheep  $\beta$ -lactoglobulin gene and the mouse whey acid protein gene. Preferably, the inserted bscAb is flanked on its 3' side by cognate genomic sequences from a mammary-specific gene. This provides a polyadenylation site and transcript-stabilizing sequences. The expression cassette is then injected into the pronuclei of fertilized, mammalian eggs, which are then implanted into the uterus of a recipient female and allowed to gestate. After birth, the progeny are screened for the presence of the introduced DNA by Southern analysis. Milk from transgenic females is analyzed for the presence and functionality of the bscAb using standard immunological methods known in the art. The bscAb can be purified from the milk using standard methods known in the art. Transgenic production of bscAb in milk provides an efficient method for obtaining large quantities of bscAb.

Functional bscAb and fusion proteins also can be produced in transgenic plants. See, e.g., Fiedler *et al.*, *Biotech.*, 13: 1090-1093, 1995; Fiedler *et al.*, *Immunotechnology*, 3: 205-216, 1997. Such production offers several advantages including low cost, large scale output and stable, long term storage. The bscAb fragment, obtained as described above, is cloned into an expression vector containing a promoter sequence and encoding a signal peptide sequence, to direct the protein to the endoplasmic reticulum. A variety of promoters can be utilized, allowing the practitioner to direct the expression product to particular locations within the plant. For example, ubiquitous expression in tobacco plants can be achieved by using the strong cauliflower mosaic virus 35S promoter, while organ specific expression is achieved via the seed specific legumin B4 promoter. The expression cassette is transformed according to standard methods known in the art. Transformation is verified by Southern analysis. Transgenic plants are analyzed for the presence and functionality of the bscAb using standard immunological methods known in the art. The bscAb can be purified from the plant tissues using standard methods known in the art.

Additionally, transgenic plants facilitate long term storage of bscAb and fusion proteins. Functionally active scFv proteins have been extracted from tobacco leaves

WO 03/011342

PCT/GB02/03494

after a week of storage at room temperature. Similarly, transgenic tobacco seeds stored for 1 year at room temperature show no loss of scFv protein or its antigen binding activity.

Functional bscAb and fusion proteins also can be produced in insect cells.

- 5 See, e.g., Mahiouz *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 212: 149-160 (1998). Insect-based expression systems provide a means of producing large quantities of homogenous and properly folded bscAb. The baculovirus is a widely used expression vector for insect cells and has been successfully applied to recombinant antibody molecules. See, e.g., Miller, L.K., *Ann. Rev. Microbiol.*, 42: 177 (1988); Bci *et al.*, *J. Immunol. Methods*,  
10 186: 245 (1995). Alternatively, an inducible expression system can be utilized by generating a stable insect cell line containing the bscAb construct under the transcriptional control of an inducible promoter. See, e.g., Mahiouz *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 212: 149-160 (1998). The bscAb fragment, obtained as described above, is cloned into an expression vector containing the *Drosophila* metallothionein  
15 promoter and the human IHLA-A2 leader sequence. The construct is then transfected into *D. melanogaster* SC-2 cells. Expression is induced by exposing the cells to elevated amounts of copper, zinc or cadmium. The presence and functionality of the bscAb is determined using standard immunological methods known in the art. Purified bscAb is obtained using standard methods known in the art.

- 20 The polymers used in the current invention are meant to provide a backbone upon which a single molecule or a plurality of molecules of an agent may be attached. A plurality of molecules, as used herein, means more than one molecule. Additionally, more than one kind of agent may be attached to the same backbone to allow delivery of multiple agents on a single polymer. Agents that may be attached to  
25 the same polymeric backbone may differ in properties including, but not limited to, stereochemistry, chemical formula, radioactive isotope number, atomic weight, half-life, activity, specificity, energy of activation, radioactivity and potency.

- Exemplary polymers and polymer backbones of the invention are polymers of single amino acids such as polylysine, polyglutamic (E; single letter code) and aspartic  
30 acids (D), including D-amino acid analogs of the same. In one embodiment, unnatural amino acids, e.g., D-amino acids, are incorporated into the backbone structure to

WO 03/011342

PCT/GB02/03494

ensure that, when used with the final mAb/polymer conjugate system, the arm of the mAb which recognizes the polymer conjugate is completely specific. Co-polymers, as used herein, means polymers of two or more amino acids, including, but not limited to, polymers of three amino acids, polymers of four amino acids and polymers of five amino acids. Co-polymers such as poly(Lys-Glu) (poly[KE]) are especially useful, when such co-polymers are selected with the building blocks in desirable ratios to each other. These ratios may be advantageously from 1:10 to 10:1, in the case of poly[KE] or poly[KD]. More complex co-polymers based on amino acid building blocks such as poly(Lys-Ala-Glu-Tyr) (KAET; 5:6:2:1) may also be employed. The molecular weight of the polymer used is generally within the range 1,000 to 100,000 Daltons. Amino acid building blocks are chosen not only for their ability to act as carriers for the recognition hapten and therapy agent, but also for the physical and biological properties that the individual building blocks can make to the overall polymer conjugates. For instance, a preferred polymer conjugate is one that retains adequate solubility even when multiply substituted with hydrophobic drug moieties. In the case of polypeptides this often means an abundance of charged residues being present. Another preferred property is engendered in a final polymer conjugate that retains a net negative charge at physiological pH, since agents with net positive charges can sometimes bind non-specifically to cells and tissues. In the case of polypeptides a preponderance of acidic residues such as aspartate and glutamate most readily satisfy this criteria. A third preferred property is that the polymer backbone is stable to serum enzymes such as esterases, and carboxy- and amino-peptidases. For this preference, polypeptides can incorporate D-amino acids, and will be acetylated and amidated, at the N- and C-termini, respectively. In terms of preferred molecular weight ranges base polymer weights between 5,000 and 25,000 are especially preferred.

However, smaller polymer conjugates of completely defined molecular weight are also preferred within the scope of the invention. These may be produced as chemically defined entities by solid-phase peptide synthesis techniques, readily producing polypeptides of from 2-50 residues chain length. A second advantage of this type of reagent, other than precise structural definition, is the ability to place

WO 03/011342

PCT/GB02/03494

single or any desired number of chemical handles at certain points in the chain. These can be later used for attachment of recognition haptens and therapeutic drugs at chosen levels of each moiety. For instance, a preferred agent is a 40-mer of 38D-glutamic acid residues, containing two lysine units, the latter of which are epsilon-substituted with recognition units such as DTPA. The remaining glutamic acid residues are then partially substituted with a chemotherapy drug such as taxol, 10-hydroxycamptothecin, 2-pyrrolinodoxorubicin, or melphalan. The remaining glutamic acid residues are then partially substituted with a chemotherapy drug such as taxol, 10-hydroxycamptothecin, 2-pyrrolinodoxorubicin, or melphalan. The substitution ratio is varied, depending on the hydrophobicity of that drug addend. Also, choice of the recognition hapten can also influence overall water solubility of the final conjugate, and for this purpose, hydrophilic moieties such as DTPA are especially preferred. Generally, a substitution ratio of drug to polymer will be in the 10-50% range of available sites, leaving enough unsubstituted residues to maintain the desirable physical properties outlined.

Polymers other than polypeptides can be used within the scope of the invention. Poly(ethylene) glycol [PEG] has desirable *in vivo* properties for a multi-specific antibody prodrug approach, and can be obtained in a variety of forms having different chemical functionalities at the ends of the polymer. Most PEG derivatives have just two functionally reactive sites, at either end of the polymer chain. Agents derivatized from such PEGs, such as, for example, di-SN-38-PEG can be considered as the shortest member of a class of SN-38-polymer prodrugs. The desirable *in vivo* properties of PEG derivatives are counter-balanced by the limited loading capacity due to their dimeric functionality. However, more recently, preparation of PEG copolymers having greater hapten-bearing capacity have been described, such as those described by Poiani et al. (Bioconjugate Chem., 5:62-630, 1994). PEG derivatives activated at both ends, for instance as their bis(succinimidyl) carbonate derivatives are co-polymerized with multi-functional diamines such as lysine. The product of such co-polymerization, containing (-Lys(COOH)-PEG-Lys(COOH)-PEG)<sub>n</sub> repeat units wherein the lysyl carboxyl group is not involved in the polymerization process, can be used for attachment of hapten residues such as DTPA or drug residues such as SN-38.

WO 03/011342

PCT/GB02/03494

The hapten, such as DTPA, or the drug, such as SN-38, may also be reacted with the free carboxyl groups remaining on the termini of the PEG-polylysyl conjugate. Most preferably, a significant amount of amino acid content is used, and the drug will be attached to the amino acid side-chains. The recognition haptens are then appended to the termini of the PEG derivatives.

Other synthetic polymers that can be used to carry recognition haptens and drug include N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide (HMPA) copolymers, poly(styrene-co-maleic acid/anhydride (SMA), poly(divinylether maleic anhydride) (DIVEMA), polyethyleneimine, ethoxylated polyethyleneimine, starburst dendrimers and poly(N-vinylpyrrolidone) (PVP). As an example, DIVEMA polymer comprised of multiple anhydride units is reacted with a limited amount of SN-38 to produce a desired substitution ratio of drug on the polymer backbone. Remaining anhydride groups are opened under aqueous conditions to produce free carboxylate groups. A limited number of the free carboxylate groups are activated using standard water-soluble peptide coupling agents (e.g. EDAC) [Contributors: Please define] and coupled to a recognition moiety bearing a free amino group. An example of the latter would be histaminyI-succinyl-glycyl-lysine amide, (HSGK-NH<sub>2</sub>) since antibodies have already been raised to the HSG portion of the compound. The free epsilon lysine residue then becomes the point of attachment to the polymer backbone for the recognition hapten.

Finally, in certain instances, the polymer used can be a naturally occurring polymer. An instance of this is the use of apo-metallothionein, which is a low MW protein having seven free thiol groups. This protein can be coupled to calicheamicin by disulfide exchange, to produce a disulfide-linked poly-calicheamicin conjugate. Further, the protein can have a limited number of lysyl-residues modified to carry a recognition hapten such as DTPA, DOTA, HSG, etc., prior to any drug conjugation.

Polymers useful for carrying the radionuclide and recognition haptens are selected for their suitability for carrying a particular radionuclide. When the polymer backbone consists of amino-acids, for instance, all of the amino acids of the backbone may be in the D- or L- configuration, or their configurations may be mixed. For example, polymers useful for carrying the radionuclide iodine-131 include a polymer made up of purely D-tyrosine amino acids as well as random co-polymers such as

WO 03/011342

PCT/GB02/03494

poly(Glu.Tyr) [1:1], poly(Glu.Tyr) [4:1] and poly(Lys.Ala.Glu.Tyr) [5:6:2:1]. In these instances, the polymer contains tyrosine amino acid residues that are readily substituted by radioiodine using methods well known in the art.

In one embodiment, the capture arm of the msAb will recognize a recognition hapten that is appended to the polymer backbone of the polymer conjugate. If the polymer conjugate comprises a separate recognition hapten, the general formula of the polymer conjugate is (recognition hapten)<sub>n</sub>-(polymer backbone)-(agent)<sub>m</sub>, where n and m are integers, including zero. However, both n and m can not be zero. If m is zero, then the recognition hapten will necessarily act as the agent that is to be targeted towards the target site. Likewise, if n is zero, then the polymer backbone or the agent will serve as the hapten or antigen for the capture arm.

Examples of recognition haptens include, but are not limited to, metal ion chelates of diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA). Antibodies have been against indium-DTPA by at least two independent laboratories. When used for radioimmunodiagnosis and radioimmunotherapy as low molecular weight complexes, such metal chelates have the desirable property of being rapidly eliminated via the urinary system if they do not bind to a tumor-pretargeted msAb. In this type of recognition system, the antibodies can be reactive against the free chelator or the chelate (metal complex of the chelator). Furthermore, antibodies against indium-DTPA can and do have different affinities for DTPA when the chelator is complexed with different metals. This can be used to an advantage since the capture arm of a multi-specific antibody can be tailored for affinity by simply varying the metal held by the chelate. Antibodies can also be raised against other metal chelators, such as 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid (DOTA), or N, N' di[2-hydroxy-5-(ethylene-3-carboxy)benzyl]ethylenediamine N,N'-diacetic acid (HBED). Antibodies raised against the macrocyclic chelate DOTA can be more accepting of different metal substitutions, since the central ring is sterically rigid. Thus, anti-DOTA mAbs may be used with a variety of metal substituents, or even with no metal present at all. In a preferred embodiment, the msAb of the current invention comprises a capture arm that recognizes or binds to DOTA or a metal complex of DOTA.

WO 03/011342

PCT/GB02/03494

The recognition hapten of the current invention does not need to be a chelator or a metal chelate. Other low molecular weight molecules capable of generating a strong immune response can be used to prepare antibodies. An instance of this is the histaminyl-succinyl glycine (HISG) hapten, which is a hydrophilic species to which antibodies have been raised. One particular antibody, termed 679, has been described extensively in the scientific literature. This and the anti-chelate type of capture arm of the multi-specific antibody were designed to be hydrophilic in nature, and to be used with low molecular weight diagnostic and therapeutic agents. With the current invention, this aforementioned need for great hydrophilicity is not so stringent, since the polymer will be imparting the bulk of the physical properties of the final therapeutic agent. In turn, this allows for the contemplation of many more immunogens that could be used to raise antibodies useful under *in vivo* conditions. Commonly used immunogens include fluorescein, 2,4-dinitrophenyl derivatives and others. Additionally, recognition haptens can include amino acid residues contained within a peptide or other molecule.

Alternatively, epitopes comprised within the polymer backbone itself can be used as recognition haptens.

A polymer substituted with a drug of choice can also be used as an immunogen, as can a drug of choice attached to a well-known immunogenic agent such as KLH. The polymer or the drug-polymer conjugate can be attached to a macromolecule to enhance immunogenicity, and that conjugate used as an immunogen, with screening for antibody expression done using standard methods. Production of antibodies against a particular drug can have its advantages, while the production of antibodies against the polymer backbone can have the advantage of producing a 'universal' recognition MAb. Thus, as when using distinct recognition units such as DTPA, HSG or DOTA, secondary antibody recognition is not tied to any particular drug, and the same mAb can be used against a variety of drugs conjugated to the same polymer backbone. This embodiment will be useful if two different polymer-drug conjugates will be used in combination (in order to gain the advantage of using several drugs with different modes of action), in a situation that parallels current combination chemotherapy.

WO 03/011342

PCT/GB02/03494

The recognition haptens of the polymer conjugate can comprise a known immunogenic recognition moiety, for example, a known hapten. Using a known hapten, for example, fluorescein isothiocyanate (FITC), higher specificity of the polymer conjugate for the antibody is exhibited. This occurs because antibodies raised to the hapten are known and can be incorporated into the inventive multi-specific antibody. Thus, binding of the polymer conjugate with an attached chelator or chelate would be highly specific for the inventive antibody or antibody fragment. Another example of a hapten to be attached onto the polymer conjugate is vitamin B12. The use of vitamin B12 is advantageous since anti-B12 mAbs are known and no free serum B12 exists. Therefore, great specificity for the antibody may be exhibited.

In another embodiment, a radionuclide, used for imaging and/or therapy, may be integrated into the design of the original recognition hapten. For instance, Ac-Gly-D-iodo-Tyr-D-Trp-Gly-D-Lys(Ac)-Gly-D-iodo-Tyr-D-Trp-OH may be used as an immunogen with the express purpose of raising an antibody which is reactive with an iodine-containing peptide, but not with the non-iodo version of the same peptide, namely Ac-Gly-D-Tyr-D-Trp-Gly-D-Lys(Ac)-Gly-D-Tyr-D-Trp-OH. Specificity of antibodies (Abs) for the former over the latter can be demonstrated using standard screening techniques. Of particular importance within this embodiment is the use of astatine-substituted peptides as immunogens to generate Abs and thus mAbs which recognize peptides substituted with alpha-particle-emitting astatine nuclides for radioimmunotherapy (RAIT). In other embodiments, any halogen can be integrated into the design of the original immunogen, including, for example, fluorine-18, bromine, and nuclides of iodine, for example, iodine-124 and iodine-123. Similarly, other non metals can be used, for example  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$  and  $^{35}\text{S}$ .

As with polymers bearing drug haptens, the mAb used in the invention may be raised against the polymer backbone, the radionuclide-containing hapten, or a hapten separate from the radionuclidic moiety. The latter embodiment is particularly preferred since a discrete number of recognition moieties, for example just one or two, may be added to the polymer independent of the number of radionuclide-haptens that are appended. Antibodies have been raised against specific radionuclide haptens such as indium-DTPA and DOTA, as well as other recognition haptens. One notable



WO 03/011342

PCT/GB02/03494

example is the antibody termed 679, which was raised against the low MW hapten HSG.

Any useful nuclide may be used within the scope of the invention. Particularly preferred are radionuclides that have useful diagnostic or therapeutic properties, such as indium-111 or yttrium-90, respectively. Other useful nuclides include, but are not limited to, F-18, P-32, Sc-47, Cu-62, Cu-64, Cu-67, Ga-67, Ga-68, Y-86, Y-90, Zr-89, Tc-99m, Pd-109, Ag-111, In-111, I-123, I-125, I-131, Sm-153, Gd-155, Gd-157, Tb-161, Lu-177, Re-186, Re-188, Pt-197, Pb-212, Bi-212, Bi-213, Ra-223 and Ac-225.

Tight binding of radiometallic nuclides often requires a chelating agent for the radiometal. Naturally-occurring polymeric chelating agents, such as the protein apometallothionein, can be used. Standard radiolabeling methods and precautions used in the radiolabeling of low molecular weight chelates may be used to prepare radiolabeled chelate polymers. For instance, procedures using radiometals, such as indium-111 and yttrium-90, generally require highly pure supplies of the radionuclide, deionized water in all buffer solutions, and acid-washing of glassware and plasticware used with any of the reagents during the radiolabeling procedures. Procedures using radiometals such as rhenium-188, which require a chemical reduction step to effect labeling, are best carried out using oxygen-depleted buffers and argon atmospheres overlaying the radiolabeling reactions.

The polymer conjugate may be conjugated to a variety of agents useful for treating or identifying diseased tissue. Preferably the agents that are conjugated to the polymer conjugate are selected from the group consisting of therapeutic agents, peptides, enzymes and labeled ligands. As used herein, the term therapeutic agent is used to mean any compound or molecule that will either cause, elicit or initiate a cellular or physiological response within the targeted tissue. Examples of cellular or physiological responses, which should be obvious to one skilled in the art, include, but are not limited to ion influx or efflux, initiation of second messenger pathways, synthesis of DNA, translation of mRNA, entry of the cells into the cell cycle, arrest of the cell in the cell cycle, endocytosis, release of molecules from the cell, exocytosis, cytosolic proteins acting on an internalized ligand, non-programmed cell death (cellular toxicity) and apoptosis. Examples of therapeutic agents for use with the

WO 03/011342

PCT/GB02/03494

invention include, but are not limited to, metal chelate complexes, drugs, prodrugs, radionuclides, boron addends, labeling compounds, toxins and other effector molecules, such as cytokines, lymphokines, chemokines, immunomodulators, radiosensitizers, asparaginase, boron addends and radioactive halogens. Preferably, the therapeutic agent that is conjugated to the polymer backbone is selected from the group consisting of therapeutic radioisotopes, toxins, drugs, prodrugs and boron addends.

As used herein, the term agent, ligand or compound is intended to mean a protein, nucleic acid, carbohydrate, lipid, a polymer or a small molecule.

Drugs for use with the current invention include, but are not limited to, any currently approved or not-yet-approved chemotherapy drug, as long as it can be attached to the polymer conjugate. Typically useful already approved drugs include, but are not limited to, the following agents and derivatives of these agents: anastrozole, azacytidine, bleomycin, busulfan, carboplatin, carmustine, chlorambucil, cisplatin, cladribine, cyclophosphamide, cytarabine, dacarbazine, dactinomycin, daunorubicin, docetaxel, doxorubicin, estramustine, etoposide, floxuridine, fludarabine, fluorouracil, flutamide, gemcitabine, hydroxyurea, idarubicin, ifosfamide, irinotecan, lomustine, mechlorethamine, megestrol, melphalan, mercaptopurine, methotrexate, mitomycin, mitotane, mitoxantrone, paclitaxel, pentostatin, procarbazine, tamoxifen, teniposide, thioguanine, thiotepa, topotecan, vinblastine, vincristine, and vinorelbine.

Additionally, the polymer conjugate may comprise a therapeutic agent consisting of boron addends to be used in Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) protocols. BNCT is a binary system designed to deliver ionizing radiation to tumor cells by neutron irradiation of tumor-localized boron-10 atoms. BNCT is based on the nuclear reaction which occurs when a stable isotope, isotopically enriched B-10 (present in 19.8% natural abundance), is irradiated with thermal neutrons to produce an alpha particle and a Li-7 nucleus. These particles have a path length of about one cell diameter, resulting in high linear energy transfer. Just a few of the short-range 1.7 MeV alpha particles produced in this nuclear reaction are sufficient to target the cell nucleus and destroy it. Success with BNCT of cancer requires methods for localizing

WO 03/011342

PCT/GB02/03494

a high concentration of boron-10 at tumor sites, while leaving non-target organs essentially boron-free. Compositions and methods for treating tumors in patients using pre-targeting msAb for BNCT are described in U.S.P.N. 6,228,362 and can easily be modified in accordance with the present invention, and is hereby  
5 incorporated by reference. Additionally, other elements are suitable for neutron capture reactions. One example is uranium. Uranium, in large amounts, can be bound by naturally occurring chelating agents such as ferritin. Such strategies have been described in the art, for example U.S.P.N. 6,228,362 and references cited therein, are easily adaptable to the present invention and are hereby incorporated in their entirety  
10 by reference.

Additionally, peptides and enzymes may be conjugated to polymer conjugate. Enzymes and peptides conjugated to the polymer conjugate may be useful for such things as activating a prodrug, improving the efficacy of a normal therapeutic agent by controlling the body's detoxification pathways, acting as a co-factor, acting as a ligand  
15 for other proteins or increasing the target-specific toxicity of a drug.

In one embodiment of the current invention, a msAb is first administered to the subject, followed by administration of a polymer-enzyme conjugate. After the enzyme is pre-targeted to the target site, a cytotoxic drug is injected, which is known to act at the target site, or a prodrug form thereof which is converted to the drug *in situ*  
20 by the pre-targeted enzyme. The drug is one which is detoxified to form an intermediate of lower toxicity, most commonly a glucuronide, using the mammal's ordinary detoxification processes. The detoxified intermediate, e.g., the glucuronide, is reconverted to its more toxic form by the pre-targeted enzyme and thus has enhanced cytotoxicity at the target site. This results in a recycling of the drug.  
25 Similarly, an administered prodrug can be converted to an active drug through normal biological processes. The pre-targeted enzyme improves the efficacy of the treatment by recycling the detoxified drug. This approach can be adopted for use with any enzyme-drug pair. Similar pre-targeting strategies have been described in U.S.S.N. 09/399,021. Those methodologies are easily adaptable to the present invention and  
30 are hereby incorporated in their entirety by reference.

WO 03/011342

PCT/GB02/03494

In an alternative embodiment, the enzyme-polymer conjugate can be mixed with the targeting mAb prior to administration to the subject. After a sufficient time has passed for the enzyme-polymer-mAb conjugate to localize to the target site and for unbound conjugate to clear from circulation, a prodrug is administered. As  
5 discussed above, the prodrug is then converted to the drug *in situ* by the pre-targeted enzyme.

As used herein, the term prodrug is used to mean a therapeutic agent that is administered in an inactive state and is subsequently converted to a more active state. Additionally, prodrug is also used to mean an agent that is active upon administration,  
10 and is subsequently converted to a more active state. Furthermore, prodrug may also mean an agent that is not specific in its activity upon administration, and is subsequently converted to a more specific-acting agent. As described above, the conversion of a prodrug may take place either within the subject or not. The conversion may also be a natural process where the prodrug is naturally metabolized  
15 by the body to a more active or specific agent, or it may be a synthetic process where an additional agent is administered to convert the prodrug to a more active or specific state.

Certain cytotoxic drugs that are useful for anticancer therapy are relatively insoluble in serum. Some are also quite toxic in an unconjugated form, and their  
20 toxicity is considerably reduced by conversion to prodrugs. Conversion of a poorly soluble drug to a more soluble conjugate, e.g., a glucuronide, an ester of a hydrophilic acid or an amide of a hydrophilic amine, will improve its solubility in the aqueous phase of serum and its ability to pass through venous, arterial or capillary cell walls and to reach the interstitial fluid bathing the tumor. Cleavage of the prodrug deposits  
25 the less soluble drug at the target site. Many examples of such prodrug-to-drug conversions are disclosed in Hansen U.S.P.N. 5,851,527.

Conversion of certain toxic substances such as aromatic or alicyclic alcohols, thiols, phenols and amines to glucuronides in the liver is the body's method of  
30 detoxifying them and making them more easily excreted in the urine. One type of anti-tumor drug that can be converted to such a substrate is epirubicin, a 4-epimer of doxorubicin (Adriamycin), which is an anthracycline glycoside and has been shown to

WO 03/011342

PCT/GB02/03494

be a substrate for human beta-D-glucuronidase See, e.g., Arcamone, *Cancer Res.*, 45:5995, 1985. Other analogues with fewer polar groups are expected to be more lipophilic and show greater promise for such an approach. Other drugs or toxins with aromatic or alicyclic alcohol, thiol or amine groups are candidates for such conjugate formation. These drugs, or other prodrug forms thereof, are suitable candidates for the site-specific enhancement methods of the present invention.

The prodrug CPT-11 (irinotecan) is converted *in vivo* by carboxylesterase to the active metabolite SN-38. Although SN-38 is a highly effective anti-tumor agent, therapeutic doses can not be administered to subjects due to its toxicity. One application of the invention, therefore, is to target such therapies to the tumor site using a mAb specific for a tumor-associated antigen and a hapten (e.g. di-DTPA) followed by injection of a di-DTPA-carboxylesterase-polymer conjugate. Once a suitable tumor-to-background localization ratio has been achieved, the CPT-11 is given and the tumor-localized carboxylesterase serves to convert CPT-11 to SN-38 at the tumor. Due to its poor solubility, the active SN-38 will remain in the vicinity of the tumor and, consequently, will exert an effect on adjacent tumor cells that are negative for the antigen being targeted. This is a further advantage of the method. Modified forms of carboxylesterases have been described and are within the scope of the invention. See, e.g., Potter *et al.*, *Cancer Res.*, 58:2646-2651 and 3627-3632, 1998.

Etoposide is a widely used cancer drug that is detoxified to a major extent by formation of its glucuronide and is within the scope of the invention. See, e.g., Hande *et al.*, *Cancer Res.*, 48: 1829-1834, 1988. Glucuronide conjugates can be prepared from cytotoxic drugs and can be injected as therapeutics for tumors pre-targeted with mAb-glucuronidase conjugates. See, e.g., Wang *et al.*, *Cancer Res.*, 52:4484-4491, 1992. Accordingly, such conjugates also can be used with the pre-targeting approach described here. Similarly, designed prodrugs based on derivatives of daunomycin and doxorubicin have been described for use with carboxylesterases and glucuronidases. See, e.g., Bakina *et al.*, *J. Med Chem.*, 40:4013-4018, 1997. Other examples of prodrug/enzyme pairs that can be used within the present invention include, but are not limited to, glucuronide prodrugs of hydroxy derivatives of phenol mustards and

WO 03/011342

PCT/GB02/03494

beta-glucuronidase; phenol mustards or CPT- 11 and carboxypeptidase; methotrexate-substituted alpha-amino acids and carboxypeptidase A; penicillin or cephalosporin conjugates of drugs such as 6-mercaptopurine and doxorubicin and beta-lactamase; etoposide phosphate and alkaline phosphatase.

5 In other embodiments of the present invention, the enzyme capable of activating a prodrug at the target site or improving the efficacy of a normal therapeutic by controlling the body's detoxification pathways is conjugated to the recognition hapten. The enzyme-hapten-polymer conjugate is administered to the subject following administration of the pre-targeting msAb and is directed to the target site. After the  
10 enzyme is localized at the target site, a cytotoxic drug is injected, which is known to act at the target site, or a prodrug form thereof which is converted to the drug *in situ* by the pre-targeted enzyme. As discussed above, the drug is one which is detoxified to form an intermediate of lower toxicity, most commonly a glucuronide, using the mammal's ordinary detoxification processes. The detoxified intermediate, *e.g.*, the  
15 glucuronide, is reconverted to its more toxic form by the pre-targeted enzyme and thus has enhanced cytotoxicity at the target site. This results in a recycling of the drug. Similarly, an administered prodrug can be converted to an active drug through normal biological processes. The pre-targeted enzyme improves the efficacy of the treatment by recycling the detoxified drug. This approach can be adopted for use with any  
20 enzyme-drug pair. In an alternative embodiment, the enzyme-hapten-polymer conjugate can be mixed with the targeting msAb prior to administration to the subject. After a sufficient time has passed for the enzyme-hapten-polymer-msAb conjugate to localize to the target site and for unbound conjugate to clear from circulation, a prodrug is administered. As discussed above, the prodrug is then converted to the  
25 drug *in situ* by the pre-targeted enzyme.

In another embodiment of the present invention, the polymer conjugate may be conjugated to a prodrug. The pre-targeting msAb is administered to the subject and allowed to localize to the target and substantially clear circulation. At an appropriate later time, a polymer conjugate comprising a prodrug, for example poly-glutamic acid  
30 (SN-38-ester)<sub>10</sub>, is given, thereby localizing the prodrug specifically at the tumor target. It is known that tumors have increased amounts of enzymes released from

WO 03/011342

PCT/GB02/03494

intracellular sources due to the high rate of lysis of cells within and around tumors. A practitioner can capitalize on this fact by appropriately selecting prodrugs capable of being activated by these enzymes. For example, carboxylesterase activates the prodrug poly-glutamic acid (SN-38-ester)<sub>10</sub> by cleaving the ester bond of the poly-glutamic acid (SN-38-ester)<sub>10</sub> releasing large concentrations of free SN-38 at the tumor. Alternatively, the appropriate enzyme also can be targeted to the tumor site.

After cleavage from the polymer conjugate, the drug is internalized by the tumor cells. Alternatively, the drug can be internalized as part of an intact complex by virtue of cross-linking at the target. The polymer conjugate may induce internalization of tumor-bound mAb and thereby improve the efficacy of the treatment by causing higher levels of the drug to be internalized.

A variety of prodrugs can be conjugated to the polymer conjugate. The above exemplifications of polymer use are concerned with SN-38, the active metabolite of the prodrug CPT-11 (irinotecan). SN-38 has an aromatic hydroxyl group that was used in the above descriptions to produce aryl esters susceptible to esterase-type enzymes. Similarly the camptothecin analog topotecan, widely used in chemotherapy, has an available aromatic hydroxyl residue that can be used in a similar manner as described for SN-38, producing esterase-susceptible polymer-prodrugs.

Doxorubicin also contains aromatic hydroxyl groups that can be coupled to carboxylate-containing polymeric conjugates using acid-catalyzed reactions similar to those described for the camptothecin family. Similarly, doxorubicin analogs like daunomycin, epirubicin and idarubicin can be coupled in the same manner. Doxorubicin and other drugs with amino 'chemical handles' active enough for chemical coupling to polymeric conjugates can be effectively coupled to conjugates via these free amino groups in a number of ways. Polymers bearing free carboxylate groups can be activated *in situ* and the activated polymers mixed with doxorubicin to directly attach the drug to the side-chains of the polymer via amide bonds. Amino-containing drugs can also be coupled to amino-pendant polymers by mixing commercially available and cleavable cross-linking agents, such as ethylene glycobis(succinimidylsuccinate) (EGS) (Pierce Chemical Co., Rockford, IL) or bis-[2-(succinimido-oxycarbonyloxy)ethyl]sulfone (BSOCOES) (Molecular Biosciences,

WO 03/011342

PCT/GB02/03494

Huntsville, AL), to cross-link the two amines as two amides after reaction with the bis(succinimidyl) ester groups. This is advantageous as these groups remain susceptible to enzymatic cleavage. For example, (doxorubicin-EGS)<sub>n</sub>-poly-lysine remains susceptible to enzymatic cleavage of the diester groups in the EGS linking chain by enzymes such as esterases. Doxorubicin also can be conjugated to a variety of peptides, for example, HyBnK(DTPA)YK(DTPA)-NH<sub>2</sub>, using established procedures (HyBn = p-H<sub>2</sub>NNHC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CO<sub>2</sub>l). See Kaneko *et al.*, *J. Bioconjugate Chem.*, 2: 133-141, 1991.

In one preferred embodiment, the therapeutic agent conjugated to the polymer conjugate comprises doxorubicin coupled to the polymer conjugate comprising amine residues and a chelating agent, such as DTPA, to form a DTPA-polymeric peptide-doxorubicin conjugate, wherein the DTPA forms the recognition hapten for a pretargeted bsMab. Preferably, the polymer conjugate comprises a tyrosyl-lysine dipeptide, *e.g.*, poly[Tyr-Lys](DTPA)-NH<sub>2</sub>, and more preferably still it comprises poly[Lys(DTPA)-Tyr-Lys(DTPA)]-NH<sub>2</sub>. Doxorubicin phenyl hydrazone conjugates to bis-DTPA containing peptides are particularly desirable in a therapeutic context.

Methotrexate also has an available amino group for coupling to activated carboxylate-containing polymers, in a similar manner to that described for doxorubicin. It also has two glutamyl carboxyl groups (alpha and gamma) that can be activated for coupling to amino-group containing polymers. The free carboxylate groups of methotrexate can be activated *in situ* and the activated drug mixed with an amino-containing polymer to directly attach the drug to the side-chains of the polymer via amide bonds. Excess unreacted or cross-reacted drug is separated readily from the polymer-drug conjugate using size-exclusion or ion-exchange chromatography.

Maytansinoids and calicheamicins (such as esperamycin) contain mixed di- and tri-sulfide bonds that can be cleaved to generate species with a single thiol useful for chemical manipulation. The thiomaytensinoid or thioesperamycin is first reacted with a cross-linking agent such as a maleimido-peptide that is susceptible to cleavage by peptidases. The C-terminus of the peptide is then activated and coupled to an amino-containing polymer such as polylysine.



WO 03/011342

PCT/GB02/03494

In still other embodiments, the multi-specific antibody-directed delivery of therapeutics or prodrug polymers to *in vivo* targets can be combined with multi-specific antibody delivery of radionuclides, such that combination chemotherapy and radioimmunotherapy is achieved. Each therapy can be conjugated to the polymer

5 conjugate and administered simultaneously, or the nuclide can be given as part of a first polymer conjugate and the drug given in a later step as part of a second polymer conjugate. In one simple embodiment, a polymer containing a single prodrug and a single nuclide is constructed. For example, a polymer conjugate, where the polymer backbone is composed of a peptide polymer, can be used, whereby SN-38 is attached

10 to the gamma glutamyl carboxyl group as an aryl ester, while the chelate DOTA is attached to the epsilon amino group as an amide, to produce a polymer-prodrug-recognition hapten complex, for example poly[Glu(SN-38)<sub>10</sub>-Lys(Y-90-DOTA)<sub>2</sub>]. The DOTA chelate can then be radiolabeled with various metals for imaging and therapy purposes including In-111, Y-90, Sm-153, Lu-177 and Zr-89. As the metal-

15 DOTA complex may represent the recognition hapten on the polymer conjugate, the only requirement for the metal used as part of the DOTA complex is that the secondary recognition antibody also used recognizes that particular metal-DOTA complex at a sufficiently high affinity. Generally, this affinity (log K<sub>d</sub>) is between 6-11. Also, triply substituted polymers can be used, such as poly[Glu(Sn-38)<sub>10</sub>-Lys(Y-

20 90-DOTA)<sub>n</sub>-(histamine-succinate)<sub>m</sub>], where n and m are integers, such that the recognition hapten is independent of the radioimmunotherapy (therapeutic) agent. The prodrug is then activated by carboxylesterases present at the tumor site or by carboxylesterases targeted to the site using a second polymer conjugate.

Alternatively, a combination therapy can be achieved by administering the

25 chemotherapy and radioimmunotherapy agents in separate steps. For example, a subject expressing CEA-tumors is first administered mAb with at least one arm which specifically binds CEA and at least one other arm which specifically binds the polymer whose recognition hapten is a conjugate of yttrium-DOTA. Later the subject is treated with a polymer conjugate comprising a conjugate of yttrium-DOTA-beta-glucuronidase. After sufficient time for mAb and enzyme localization and clearance,

30 a second polymer conjugate is given. The second polymer conjugate localizes to the

WO 03/011342

PCT/GB02/03494

tumor by virtue of msAb at the tumor that are not already bound to a first polymer conjugate. Localization of both the prodrug and its respective enzyme to the target site enhances the production of active drug by ensuring that the enzyme is not substrate limited. This embodiment constitutes a marked improvement of current prodrug methodologies currently practiced in the art.

Another advantage of administering the prodrug-polymer in a later step, after the nuclide has been delivered as part of a previously given polymer conjugate, is that the synergistic effects of radiation and drug therapy can be manipulated and, therefore, maximized. It is hypothesized that tumors become more 'leaky' after RAIT due to radiation damage. This can allow a polymer-prodrug to enter a tumor more completely and deeply. This results in improved chemotherapy.

Alternatively, the RAIT therapy agent can be attached to msAb rather than the polymer conjugate. For example, an anti-CEA x anti-DTPA msAb conjugated to Y-90-DOTA is administered first to a subject with CEA-expressing tumors. In this instance, advantage is taken of the selectivity of certain anti-chelate mAbs in that an anti-indium-DTPA antibody does not bind to a yttrium-DOTA chelate. After the Y-90-DOTA-anti-CEA x anti-indium-DTPA has maximized at the tumor and substantially cleared non-target tissue, a polymer conjugate comprising indium-DTPA-glucuronidase is injected and localized specifically to the CEA tumor sites. The subject is then injected with a polymer-prodrug such as poly(Glu)(SN-38)<sub>10</sub>. The latter is cleaved selectively at the tumor to active monomeric SN-38, successfully combining chemotherapy with the previously administered RAIT.

It should also be noted that a multi-specific antibody or antibody fragment can be used in the present method, with at least one binding site specific to an antigen at a target site and at least one other binding site specific to an enzyme. Such an antibody can bind the enzyme prior to injection, thereby obviating the need to covalently conjugate the enzyme to the antibody, or it can be injected and localized at the target site and, after non-targeted antibody has substantially cleared from the circulatory system of the subject, the enzyme can be injected in an amount and by a route which enables a sufficient amount of the enzyme to reach the pre-targeted msAb and bind to it to form an antibody-enzyme conjugate *in situ*.

WO 03/011342

PCT/GB02/03494

The polymer conjugate may also be conjugated to a variety of agents that act as labeling ligands that can be useful for identifying normal or diseased tissue. In one preferred embodiment of the current invention, the agents that are conjugated to the polymer conjugate are labeled ligands, also referred to as diagnostic agents. Examples of labeled ligands include, but are not limited to, radioisotopes, coloring agents (such as the biotin-streptavidin complex), contrasting agents, fluorescent compounds or molecules and enhancing agents for magnetic resonance imaging (MRI). Preferably, the labeled ligands are selected from the group consisting of radioisotopes, enhancing agents for use in magnetic resonance imaging, contrasting agents and coloring agents.

In the practice of one embodiment of the invention, the mAb is administered prior to administration of a diagnostic agent which is conjugated with the polymer conjugate. After sufficient time has passed for the mAb to target to the diseased tissue, the diagnostic agent is administered. Subsequent to administration of the diagnostic agent, imaging can be performed. Tumors can be detected in body cavities by means of directly or indirectly viewing various structures to which light is delivered and then collected. Lesions at any body site can be viewed so long as nonionizing radiation can be delivered and recaptured from these structures. For example, positron emission tomography (PET) which is a high resolution, non-invasive, imaging technique can be used with the inventive antibodies for the visualization of human disease. In PET, 511 keV gamma photons produced during positron annihilation decay are detected. Similar pre-targeting strategies for PET using Fluorine-18 and Gallium-68 have been described, respectively in U.S.P.N. 6,187,284 and U.S.S.N. 09/644,706. The methodologies described in these applications are easily adaptable to the present invention and are hereby incorporated in their entirety by reference.

As another example, the present inventive antibodies or antibody fragments can be used in a method of photodynamic diagnosis or therapy. In the diagnostic method, a diagnostic agent is injected, for example, systemically, and laser-induced fluorescence can be used by endoscopes to detect sites of cancer which have accreted the light-activated agent. For example, this has been applied to fluorescence bronchoscopic disclosure of early lung tumors (Dajron *et al.*, *Chest* 76:32, 1979), incorporated herein by reference. In another example, the inventive antibodies and antibody fragments can

WO 03/011342

PCT/GB02/03494

be used in single photon emission. For example, a Tc-99m-labeled diagnostic agent can be administered to the subject following administration of the msAbs. The subject is then scanned with a gamma camera which produces single-photon emission computed tomographic images and defines the lesion or tumor site.

- 5 The present invention also can be used in a method for photodynamic therapy. In this methodology, a photosensitizer, for example a hematoporphyrin derivative such as dihematoporphyrin ether, is administered to the subject. Anti-tumor activity is initiated by the use of strong red light, for example, at 630 nanometers wavelength. Alternate photosensitizers can be utilized, including those useful at longer
- 10 wavelengths, where skin is less photosensitized by the sun. Examples of such photosensitizers include, but are not limited to, benzoporphyrin monosacid ring A (BPD-MA), tin etiopurpurin (SnET2), sulfonated aluminum phthalocyanine (AlSPc) and lutetium texaphyrin (Lutex).

- The msAb can be given at some time prior to administration of the polymer
- 15 conjugate. The doses and timing of the reagents can be readily worked out by a skilled artisan, and are dependent on the specific nature of the reagents employed. If a msAb-F(ab')<sub>2</sub> derivative is given first, then a waiting time of 1-6 days before administration of the polymer conjugate would be appropriate. If an IgG-Fab' msAb conjugate is the primary targeting vector, then a longer waiting period before
- 20 administration of the polymer conjugate would be indicated, probably in the range of 3-15 days. If a multi-specific fusion protein, for example an anti-CEA Fab x anti-peptide scFv, is the primary targeting vector, a shorter waiting period before administration of the polymer conjugate would be indicated, probably in the range of 1-5 days.

- 25 The method of targeting an agent towards a target site also includes administering a clearing composition to the tissue to clear the unbound msAb from the tissue. The clearing agent is given between doses of the msAb and the polymer conjugate. The present inventors have discovered that a clearing agent consisting of a glycosylated anti-idiotypic Fab' fragment that recognizes or binds to the targeting
- 30 arms of the msAb. In this embodiment, a msAb is given and allowed to accrete in the targeted site. To clear residual msAb, an anti-idiotypic Ab to the msAb is given as a

WO 03/011342

PCT/GB02/03494

glycosylated Fab' fragment. The clearing agent binds to the msAb in a monovalent manner, while its appended glycosyl residues direct the entire complex to the liver, where rapid metabolism takes place. The polymer conjugate, is subsequently given to the subject. For example, an anti-CEA (MN 14 Ab) x anti-peptide msAb is given to the tissue and the msAb is allowed to accrete in the desired targeted site to its maximum extent. To clear residual msAb, an anti-idiotypic Ab to MN-14, termed W12, is given as a glycosylated Fab' fragment. The W12 Ab to the MN-14 arm of the msAb has a high affinity and the clearance mechanism differs from other disclosed mechanisms (see Goodwin, *et al., id.*), as it does not involve cross-linking, because the W12-Fab' is a monovalent moiety.

The current invention also provides a kit useful for targeting a target site within a tissue in a subject or tissue sample comprising, (a) a multi-specific antibody or antibody fragment comprising a targeting arm that binds to an antigen within said tissue, and a capture arm that binds to a polymer conjugate; and (b) a polymer conjugate that binds to said capture arm, said polymer conjugate comprising a polymer conjugated to an agent selected from the group consisting of a therapeutic agent, a peptide, an enzyme and a labeled ligand. Instruments which facilitate identifying or treating diseased tissue also may be included in the kit. Examples include, but are not limited to application devices, such as syringes. Solutions required for utilizing the disclosed invention for identifying or treating diseased tissue also may be included in the kit.

In a preferred embodiment, the polymer conjugate of the kit, as provided by the current invention, further comprises a recognition hapten.

In a preferred embodiment, the msAb of the kit may be monoclonal or polyclonal in nature, but preferably monoclonal. Furthermore, the targeting arm and the capture arm of the msAb may be monoclonal or polyclonal in nature. Preferably, either the target arm or the capture arm is monoclonal. Most preferably, the target arm and the capture arm are both monoclonal.

In another preferred embodiment, the msAb of the kit may be engineered to possess a label. Examples of labels that the msAb may possess include, but are not

WO 03/011342

PCT/GB02/03494

limited to, a labeling ligand such as the biotin-streptavidin complex and radioisotopes. Preferably, the mAb of the current invention is radiolabeled.

In another preferred embodiment, the mAb of the kit may be chimeric humanized or human, but more preferably human or humanized. In still another preferred embodiment, the targeting arm and the capture arm of the mAb may be chimeric human or humanized. Preferably, either the target arm or the capture arm is human. Most preferably, the target arm and the capture arm are both human or humanized.

In one preferred embodiment, the kit as provided by the current application may also include a clearing composition that will clear the unbound mAb from the tissue. The clearing agent is preferably given between administering or applying the mAb and administration or application of the polymer conjugate.

In another preferred embodiment, the kit of the current invention may also include a drug or prodrug. In a more preferred embodiment, the kit contains a polymer conjugate that is conjugated to an enzyme, which will convert the prodrug to an active drug.

The invention of the current application, in general, relates to a mAb/polymer conjugate recognition system for targeting tissues for disease treatment or diagnosis. Thus the polymer conjugate, and its chemistry are vital to the success of the current invention.

With exemplary recognition haptens, carboxyl-containing chelate derivatives such as DTPA, DOTA, HBED and HSG are readily coupled to amino-containing polymers by controlled activation of a limited number of their carboxylate groups using carbodiimide-like reagents. Fluorescein is readily coupled to amine-containing polymers using an isothiocyanate-derivatized analog. Similarly, amino-containing recognition haptens are readily coupled to suitable carboxyl-activated polymers having a plurality of free carboxyl groups. Haptens having aldehyde or ketone groups, or hydrazinyl or amino groups, are readily attached to polymers with the complementary functionality, with a reduction step to reduce Schiff-base type intermediates, optionally included. Haptens having a free thiol are readily attached to polymers using alkylation of activated halogeno- intermediates to give thioethers, by

WO 03/011342

PCT/GB02/03494

Michael addition, or by disulfide bond formation. Reverse wise, the free thiol can be on the polymer, and the electrophile on the hapten. Free hydroxy groups on haptens can be attached as ethers or esters, starting with a suitably derivatized polymer, while active hydrogens can be used in Mannich-type condensation reactions.

5        Some of the above discussion related to examples of polymer conjugates and haptens, apply equally generally to drugs to be used in the invention. For instance, part of the above discussion mentioned certain drugs, such as SN-38, the active metabolite of the prodrug CPT-11 (irinotecan). SN-38 has an aromatic hydroxyl group that was used in the above descriptions to produce aryl esters susceptible to  
10        esterase-type enzymes. Similarly the camptothecin analogs topotecan and 10-hydroxycamptothecin, used in chemotherapy, both have an available aromatic hydroxyl residue that can be used in a similar manner as described for SN-38, producing esterase-susceptible polymer-prodrugs. Also in this class can be placed taxol and certain Vinca alkaloids. In each instance, a drug containing a free hydroxyl  
15        group is attached to the polymer using an ester linkage. A preferred advantage of using an ester linkage is that the drug-polymer bond is cleavable, and whether localized intra- or extra-cellularly, the free and active drug can be produced over time, to exert its effect at the target site. Doxorubicin also contains a hydroxyl group that can be coupled to carboxylate-containing polymeric conjugates using acid-catalyzed  
20        reactions similar to those described for the camptothecin family.

Doxorubicin and other drugs with amino 'chemical handles' active enough for chemical coupling to polymer conjugates can be effectively coupled to conjugates via these free amino groups in a number of ways. Polymers bearing free carboxylate groups can be activated *in situ* (EDAC; water-soluble carbodiimide) and the activated  
25        polymers mixed with doxorubicin to directly attach the drug to the side-chains of the polymer via amide bonds. Amino-containing drugs can also be coupled to amino-pendant polymers by mixing a commercially available, and cleavable cross-linking agent such as ethylene glycobis(succinimidylsuccinate) (EGS, Pierce Chemical Co., Rockford, IL) or bis-[2-(succinimidocarbonyloxy)ethyl]sulfone (BSOCOES,  
30        Molecular Biosciences, Huntsville, AL) to cross-link the two amines as two amides after reaction with the bis(succinimidyl) ester groups. A preferred conjugate is one

WO 03/011342

PCT/GB02/03494

that, for instance, like (doxorubicin-EGS)<sub>n</sub>-poly-lysine remains susceptible to enzymatic cleavage of the diester groups in the EGS linking chain by enzymes such as esterases.

Numerous analogs of doxorubicin have been prepared, and many of these can also be coupled to polymers in similar ways. Exemplary of these analogs is 2-pyrrolinodoxorubicin (2-PDOX), which has been reported to be 100-1000 more toxic to tumor cells than doxorubicin itself. With 2-PDOX, the free amino group present in doxorubicin has been converted into an enamine. However, at the other end of the 2-PDOX molecule a ketone group and a hydroxy group are available for conjugation reactions. The hydroxy group can be coupled with an activated poly-glutamic acid or poly-aspartic acid polymer, or a co-polymer containing a plurality of these sub-units, using standard esterification chemistry to produce ester-linked drug-polymer conjugates. In an alternative approach, poly acidic conjugates can be partially converted to hydrazides using standard coupling chemistries, and the hydrazides can later be condensed with the ketone groups in doxorubicin or 2-PDOX. The formed Schiff bases can be used without reduction, or can be reduced by short reaction with sodium borohydride or sodium cyanoborohydride.

Other well-known drugs, such as methotrexate, also have an available amino group for coupling to activated carboxylate-containing polymers, in a similar manner to that described for doxorubicin, above. Methotrexate also has two glutamyl carboxyl groups (alpha and gamma) that can be activated for coupling to amino-group containing polymers. The free carboxylate groups of methotrexate can be activated *in situ* (EDAC) and the activated drug mixed with an amino-containing polymer to directly attach the drug to the side-chains of the polymer via amide bonds. As with most conjugations of low MW materials to polymers, excess unreacted or cross-reacted drug are separated readily from the polymer-drug conjugate using size-exclusion or ion-exchange chromatography, or using dialysis or diafiltration.

Maytansinoids and calicheamicins (such as esperamycin) can also be used within the scope of the invention. The latter contain mixed di- and tri-sulfide bonds that can be cleaved to generate species with a single thiol useful for chemical manipulation. A copolymer such as polyGlu.Lys-OH is treated with a



WO 03/011342

PCT/GB02/03494

succinimidy/maleimido cross-linking agent such that the linker adds to the free lysine amino groups of the polymer. This generates a multiplicity of maleimido residues on the polymer that can be reacted to varying substitution ratios with the thiol-containing drugs. The cross-linker used can be chosen to be susceptible to cleavage by peptidases. More preferably, drugs such as calicheamicins are linked to the polymer via a disulfide bond so that they are readily activated upon reduction. Thus co-polymers containing thiol residues such as cysteine are contemplated. In this preferred embodiment it can be emphasized that the reductive process needed to trigger the calicheamicin reaction cascade that leads to anti-growth activity, is much more likely to occur in the highly reductive intracellular compartment, as opposed to in the extra-cellular milieu. Hence multi-specific targeting agents that are inductively internalized upon cross-linking by the recognition hapten-polymer-drug conjugate are especially preferred. A key general issue is that whereas the drug-to-polymer linkage can be varied in terms of chemical bond stability, the link between the polymer backbone and the recognition hapten should be strong, and impervious to serum decomposition.

Even drugs classed as alkylating agents are within the scope of the invention, since chloro, bromo, tosyl, or mesyl mustard derivatives containing, for instance, a free carboxyl group can be coupled to polymers using active esters, azide or acid chloride intermediates, while leaving the alkylating moieties essentially intact. Alternatively, precursors of mustard agents can be coupled to polymers and the precursors, converted to the active agents by halogenation or analogous reactions.

The peptides to be used as polymers or recognition haptens are synthesized conveniently on an automated peptide synthesizer using a solid-phase support and standard techniques of repetitive orthogonal deprotection and coupling. Free amino groups in the peptide, that are to be used later for chelate conjugation, are advantageously blocked with small organic moieties, for example by acetylation. For instance, Ac-Gly-D-Tyr-D-Trp-Gly-D-Lys(Ac)-Gly-D-Tyr-D-Trp-OH, cleaved from its assembly resin is then activated through its single carboxyl moiety using active ester/anhydride methodology and coupled in multiple units to KLII. For immunogenic use, the di-cysteinyl-containing peptide Ac-Cys(Y)-D-Tyr-D-Trp-Gly-

WO 03/011342

PCT/GB02/03494

D-Cys(Y)-Gly-D-Tyr-D-Trp-OH can be removed from the resin with the thiol groups protected by methylation to generate Ac-Cys(Me)-D-Tyr-D-Trp-Gly-D-Cys(Me)-Gly-D-Tyr-D-Trp-OH. This can then be activated for KLH coupling using the same standard methods. When the peptides are prepared for later use within the msAb system, they are advantageously cleaved from the resins to generate the corresponding C-terminal amides, which will inhibit *in vivo* carboxypeptidase activity.

The components separately described in the above discussions are then applied to the treatment of subjects using the following general approaches. First, the optimum dose of multi-specific antibody is determined empirically and can be expressed in terms of mg of protein per kg or per square meter of subject. Second, the timing and dose of the hapten-polymer-agent conjugate that results in the optimum dose of drug being administered to the tumor target is determined, again, empirically, after pretargeting with the optimum dose of the multi-specific antibody. Determinations of optima such as these are readily made using standard techniques in pharmacology and radiopharmacology. Once the basic doses and timings have been determined, the method is ready to be applied more generally.

#### Examples

All references cited herein are hereby incorporated herein by reference in their entireties.

#### 20 Example 1. Preparation of poly- $\gamma$ -glutamic acid (SN-38-ester)<sub>10</sub>

A 10 g ( $2.66 \times 10^{-2}$  mole) amount of poly- $\gamma$ -glutamic acid (15-50 kDalton; Sigma Chemical Company) is mixed with 200 mL of dry, distilled dimethylformamide (DMF) and 3.92 g ( $1 \times 10^{-2}$  mole) SN-38. By means of a hydrogen chloride generator system (slow mixing of hydrochloric and concentrated sulfuric acid and passage of the resulting gas through concentrated sulfuric acid) dry hydrogen chloride gas is added to the DMF until a weight increase of 5 g has occurred. The mixture is heated under reflux for three hours using a Soxhlet extractor filled with dry magnesium sulfate to remove water from the DMF prior to its return to the reaction vial. After cooling, the product, poly- $\gamma$ -glutamic acid (SN-38-(ester)<sub>10</sub>, in DMF is treated with a ten-fold

WO 03/011342

PCT/GB02/03494

excess of diethyl ether to DMF. The collected precipitate is washed with ether, taken up in water and the aqueous solution extracted with chloroform to remove residual free SN-38. Poly- $\gamma$ -glutamic acid (SN-38-(-ester))<sub>10</sub> is collected as a lyophilized solid and the SN-38-to-polymer ratio determined spectrophotometrically.

5 Example 2. Preparation of AcLys(HSG)Glu<sub>4</sub>[10-hydroxycamptothecin]<sub>6</sub>Lys(HSG)NH<sub>2</sub>

The title peptide is prepared as a discrete entity using standard solid-phase synthetic methods with the first resin-appended lysine residue substituted with an allyloxycarbonyl epsilon protecting group and the last [N-terminus] lysyl residue  
10 protected similarly at its epsilon amino position. The N-terminus is acetylated at the conclusion of the chain synthesis. The glutamic acid gamma carboxyl groups are protected as the tert-butyl esters during peptide assembly. Alpha amino groups are protected using Fmoc and the peptide is prepared on solid phase with successive rounds of Fmoc deprotection and coupling. Then the two-epsilon Alloc groups are  
15 selectively removed. The partially protected peptide is reacted with an excess of trityl-HSG through its free carboxyl group, using appropriate carboxyl group activation agents. Finally, the tert-butyl protecting groups are removed from the lysyl along with trityl- from the HSG residues, respectively, and the peptide cleaved from the resin, with trifluoroacetic acid. The 10-hydroxycamptothecin and the HSG-  
20 containing peptide are reacted together in toluene using acid catalysis and Dean-Stark conditions to produce AcLys(HSG)Glu<sub>4</sub>[10-hydroxycamptothecin]<sub>6</sub>Lys(HSG)NH<sub>2</sub> with the 10-hydroxycamptothecin moieties linked to the peptide glutamate gamma carboxyl groups as esters.

Example 3. Coupling of doxorubicin to a random co-polymer of glutamic acid

25 A 70-150 kD random co-polymer comprised of poly(Glu,Glu-OMe), 4:1, is treated with an excess of hydrazine hydrate and allowed to stand for 24 h at room temperature. The excess hydrazine is removed by repeated dialysis, and the poly(Glu,Glu-NHNH<sub>2</sub>) is mixed with a 5 x excess (to estimated hydrazide) of doxorubicin, at a pH of 5. The mixture is allowed to stir overnight, and the excess

WO 03/011342

PCT/GB02/03494

doxorubicin is removed by repeated dialyses. The extent of doxorubicin substitution is determined spectrophotometrically. Optionally, the Schiff bases linking the doxorubicin to the polymer are reduced by overnight reaction with excess sodium cyanoborohydride.

5 Example 4. Coupling of calicheamicin to metallothionein-DOTA

A solution of DOTA is activated in a limited manner, to activate only one of the four free carboxyl units available, by reaction with a ten-fold deficit of N-hydroxy-sulfo-succinimide, and a 100 x deficit of the carbodiimide coupling agent, EDAC. A sample of metallothionein is then dialyzed into phosphate buffer, pH 8, and treated  
10 with a solution of the activated DOTA chelating agent, in 10 x molar excess to metallothionein. The coupling reaction is allowed to proceed overnight at four degrees Celsius, and the metallothionein-DOTA is purified from unreacted side-products by repeated dialyses against metal-free 0.2 M ammonium acetate buffer, pH 6, containing 1 mM EDTA. The DOTA-metallothionein conjugate is then mixed  
15 with a ten-fold excess (to estimated free thiol groups) of calicheamicins, allowed to react overnight at four degrees Celsius, and repurified from unconjugated drug by repeated dialyses against metal-free 0.2 M ammonium acetate buffer, pH 6.

Example 5. Coupling of an alkylating drug to a DTPA-polymer conjugate

A random copolymer of 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate (DMAEMA) and aminoethyl methacrylate is produced by radical polymerization with ammonium peroxydisulfate as radical initiator (60°C, 16 h). The p[DMAEMA]-co-AEMA  
20 product, containing free primary amino groups, is purified by extensive dialysis against water. It is treated with a limited amount of DTPA dianhydride, in phosphate buffer, pH 8, and again dialyzed against water to remove unstatched DTPA. The  
25 DTPA substitution ratio is estimated by titrating aliquots with increasing amounts of In-111 spiked cold indium chloride solution. The chemotherapy drug, chlorambucil, is mixed with an equimolar amount of dicyclohexylcarbodiimide and N-hydroxysuccinimide in dry dioxane. After stirring for 2 h, the formed dicyclohexylurea is filtered off. The dioxane solution of the ester-activated

WO 03/011342

PCT/GB02/03494

chlorambucil is added, in molar excess to available free amino groups, to the DTPA-p(DMAEMA)-co-AEMA polymer in phosphate buffer, pH 8, to a final dioxane concentration up to 50%. After a 30-minute reaction the pH is adjusted to 3 with hydrochloric acid, and the chlorambucil-p(DMAEMA)-co-AEMA-DTPA polymer is

5 purified by filtration from insoluble drug, and by repeated dialyses against sodium acetate buffer, pH 4.

Example 6. Development of an antibody against a polyglutamate polymer

Polyglutamic acid (average MW 15,000) is treated with a 20-fold molar deficit of the water-soluble carbodiimide EDAC, at pH 4, in the presence of a 20-fold molar deficit

10 (to poly E) of N-hydroxysulfosuccinimide. The reaction is allowed to proceed for 3 h at room temperature, and the crude mixture is then added to a solution of KLH in phosphate buffer, pH 8. The product is purified by repeated dialyses against PBS. It is used for repeated injection into immunocompetent mice, initially with complete Freund's adjuvant and later with in complete Freund's adjuvant. To measure the

15 immune response in terms of antibody titer, the same polyglutamate may be coupled to a non-specific IgG molecule (as a carrier) for better plate absorption, or absorbed directly onto an ELISA plate itself. A number of mice having good antibody titers are selected and splenocytes from these animals are fused with the mouse myeloma cell line SP2/0 according to the standard technique. Up to 3000 clones are screened by

20 ELISA for reactivity with polyglutamate. Those clones identified as secreting an IgG that binds to polyglutamate are sub-cloned, and positive hybrids selected and adapted to grow in serum-free media. The IgG is produced in quantity using standard methods of cell culture, and can be coupled as an IgG or fragmented to F(ab')<sub>2</sub> and Fab' and then coupled to a suitable targeting vector, in a similar manner to that used for the

25 anti-DTPA antibody described in detail below.

Example 7. Development of an antibody against Doxorubicin

Doxorubicin (54.3 mg;  $1 \times 10^{-4}$  mole) is mixed with a two-fold molar excess of the cross-linker bis[sulfosuccinimidyl]suberate (BS<sup>3</sup>; Pierce Chemical Co., Rockford, IL; 114.4 mg;  $2 \times 10^{-4}$  mole). The activation is allowed to proceed for 30 minutes at room

WO 03/011342

PCT/GB02/03494

temperature, and the crude mixture is then added to a solution of 100 mg of bovine serum albumin in phosphate buffer, pH 8. The product, [doxorubicin]<sub>10</sub>-BSA is purified by repeated dialyses against PBS, and used for repeated injection into immunocompetent mice, initially with complete Freund's adjuvant and later with incomplete Freund's adjuvant. To measure the immune response toward doxorubicin, in terms of antibody titer, the drug may be coupled to ovalbumin as a non-specific carrier protein, and the latter conjugate used for testing sera. A number of mice having good antibody titers are selected and splenocytes from these animals are fused with the mouse myeloma cell line SP2/0 according to the standard technique. Up to 3000 clones are screened by ELISA for reactivity with doxorubicin-ovalbumin. Those clones identified as secreting an IgG that binds to doxorubicin are sub-cloned, and positive hybrids selected and adapted to grow in serum-free media. The anti-doxorubicin IgG is produced in quantity using standard methods of cell culture, and can be coupled as an IgG or fragmented to F(ab')<sub>2</sub> and Fab' and then coupled to a suitable targeting vector, in a similar manner to that used for the anti-DTPA antibody described in detail below.

Example 8. Preparation of an anti-CEA x anti-DTPA bi-specific antibody

a) Introducing a maleimide group into IgG: A 1 mL solution of hMN-14 IgG (8.45 mg/mL) is pH adjusted with ~ 3 uL of 1 N HCl to pH 7.2. To this is added 10.7 uL of a 10 mM aqueous solution of sulfo-SMCC (1.9 fold molar excess), and the reaction mixture is left at the room temperature for 45 min. Purification is done by size-exclusion chromatography on Sephadex G50/80 in 0.1 M sodium phosphate, pH 6.5. The protein concentration (A<sub>280</sub>) and the maleimide content are determined (0.93 maleimides / IgG being found under this set of conditions). The latter determination involves reaction with a known excess of 2-mercaptoethanol (2-ME), followed by back titration of unconsumed 2-ME by Ellman's assay.

b) Reduction of 734 F(ab')<sub>2</sub> to 734 Fab': The F(ab')<sub>2</sub> fragment of the 734 MAb (1.25 mL; 10 mg) is mixed with 0.1 mL of 100 mM cysteine in 20 mM HEPES buffer, pH 7.3. The buffer also contains 150 mM sodium chloride and 10 mM EDTA, and is

WO 03/011342

PCT/GB02/03494

flushed with argon to prevent premature re-oxidation of reduced disulfide bonds. The reaction is incubated at 37°C for 50 minutes, and purified by size-exclusion chromatography using Sephadex G50/80 in 0.1 M phosphate/ 5 mM EDTA, pH 6.5, as running buffer.

- 5 c) Conjugation of the hMN-14-IgG and the 734-Fab' fragment: HMN-14-maleimide and 734 Fab', from the above reactions, are mixed in a 1:1 molar ratio. The reaction mixture is flushed with argon, and incubated at the room temperature for ~ 1h (50 min -- 1.5 h can be successfully used in different runs). At the end of the reaction a 40-fold molar excess of N-ethylmaleimide (using 2.64 mM aq solution), is added and the mixture is left overnight at 4°C, to block excess thiol groups on the Fab' fragment.
- 10 The reaction mixture is purified using size-exclusion chromatography on Sephadex G50/80 and 0.1 M sodium phosphate pH 7.3, buffer.

- d) Purification of the IgG x Fab' mAb: A column (0.9 cm outside diameter) is filled with 3 mL of Affigel-DTPA gel, and is used to separate unconjugated IgG from DTPA-containing entities. The crude reaction product from c) above, is passed slowly through the Affigel-DTPA column, previously equilibrated in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.3. Unconjugated hMN-14 passes straight through the column. Bound fractions are eluted from the affinity column using 1 M EDTA, pH 4.0, and the combined eluates from the column this process are immediately pooled, and dialyzed against 0.2 M sodium phosphate pH 6.8, with 3 buffer changes. The sample is then concentrated and purified by preparative size-exclusion HPLC on a TSK G3000SW column using 0.2 M sodium phosphate pH 6.8 as eluent. Fractions containing monomeric species corresponding to the MW of IgG x Fab' are pooled, and concentrated. Using this methodology at this scale, 7.7 mg of the conjugate is obtained (21.4 % overall yield). The product shows a single peak on HPLC, while MALDI mass spectral analysis showed an average MW of 196803 (0.2 % error rate).
- 15
- 20
- 25

Example 9. Preparation of a hormone-antibody targeting agent

The somatostatin analog DTPA-octreotide is treated with an equivalent of each of the carbodiimide EDC and N-hydroxy-sulfo-succinimide at pH 4. The mixture is

WO 03/011342

PCT/GB02/03494

allowed to stir for 2 h, and added in 20 x molar excess to the antibody 679 IgG (anti-HSG) in phosphate buffer pH 8.5. After being allowed to react overnight at 4°C, the substituted 679 MAb is purified by repeated dialysis against phosphate buffered saline. The substitution ratio of the DTPA-octreotide onto the 679 MAb is  
 5 determined by MALDI-TOF mass spectroscopy. The agent is useful against tumors expressing large numbers of somatostatin receptors.

Example 10. Treatment of a subject expressing a CEA-positive tumor

A subject who has colon cancer that expresses the CEA antigen is given a 100 mg/m<sup>2</sup> dose of the bi-specific antibody hMN-14 x 734 F(ab')<sub>2</sub> Fab'. After 24 hours, the  
 10 subject is then given an equimolar dose of the indium complex of the AcLys(DTPA)Glu<sub>6</sub>[SN-38]<sub>6</sub>Lys(DTPA)NH<sub>2</sub> DTPA-polymer-drug, conjugate, previously prepared using the method of example 2, above. The DTPA-polymer-drug is localized selectively at the tumor due to the pretargeting with the mAb, causing a high concentration of the active agent SN-38 to also be localized. Over time, free SN-  
 15 38 is released from the localized conjugate, exerting a therapeutic effect on the tumors.

Example 11. Preparation of metallothionein-(HSG)<sub>2</sub>

A solution of histamine-succinyl-glycine (HSG) is activated by a four-hour reaction with a molar equivalent of N-hydroxy-sulfo-succinimide and a molar  
 20 equivalent of EDC at pH 4 in aqueous solution. A sample of metallothionein previously dialyzed into phosphate buffer, pH 8, is treated with a solution of the activated HSG, in 5 x molar excess to metallothionein. The coupling reaction is allowed to proceed overnight at four degrees Celsius, and the metallothionein-(HSG)<sub>2</sub> is purified from unreacted side-products by repeated dialyses against metal-free 0.2 M  
 25 sodium acetate buffer, pH 4.5. The metallothionein-(HSG)<sub>2</sub> conjugate is then compounded for later reductive radiolabeling with rhenium-188 by making the solution 800 mg/mL in stannous ion containing a 100 x excess (to tin) of sodium glucoheptonate, aliquoting into vials in 1-10 mg portions, freezing over dry ice, lyophilizing, and septum-sealing the vials under vacuum or semi-vacuum with argon.



WO 03/011342

PCT/GB02/03494

Example 12. Radiolabeling of metallothionein-(HSG)<sub>2</sub> with rhenium-188

A 10-mg sample of metallothionein-(HSG)<sub>2</sub> prepared and compounded for radiolabeling with rhenium-188, as described in example 15, is reconstituted with a 2-mL fraction (100 mCi) of rhenium-188 radionuclide in physiological saline, freshly eluted from a tungsten-188/rhenium-188 tandem generator system. The solution containing the metallothionein-(HSG)<sub>2</sub> and the rhenium-188 mixture is heated for 30 minutes at 95 degrees Celsius to effect reduction of the rhenium-188 from the +7  
 5 perhenate form to a form that can be bound by the multiple free thiol groups of the metallothionein-(HSG)<sub>2</sub> polypeptide. Incorporation of rhenium-188 into  
 10 metallothionein-(HSG)<sub>2</sub> is > 90%.

Example 13. Targeting Using a BisAb and rhenium-188-metalllothionein(HSG)<sub>2</sub>

A patient presenting with a tumor that expresses the antigen termed colon specific antigen p (CSA-p) is treated with 200 mg of the bisAb Mu9 x 679 IgG x Fab' [anti CSA-p x anti-HSG]. One week later, when the amount of bisAb remaining in  
 15 circulation has dropped below 5% ID/g, and while amounts remaining in tumor deposits remain high, the patient is treated with 100 mCi of rhenium-188-metalllothionein-(HSG)<sub>2</sub>, prepared as described in example 16, above. Recognition of the HSG moieties on the rhenium-188-metalllothionein-(HSG)<sub>2</sub> by the Mu9 x 679 bisAb pretargeted via tumor antigen enables the specific delivery of the therapeutic  
 20 rhenium-188 radionuclide to tumor sites.

Example 14. Preparation of indium-DTPA-poly(Glu,Tyr) [4:1]

A solution of poly(Glu,Tyr) [4:1] in 0.2 M sodium borate buffer pH 8.5 is treated with an excess of DTPA-dianhydride. The rapid reaction either results in substitution of DTPA onto the alpha-amino group of the co-polymer, or aqueous  
 25 hydrolysis of the added anhydride groups. The DTPA-appended product is purified from low molecular weight materials by repeated dialyses against water and ammonium acetate buffer, pH 4.5. Prior to the final dialysis a three-fold molar excess of indium acetate is added to the DTPA-poly(Glu,Tyr) [4:1] intermediate, which is

WO 03/011342

PCT/GB02/03494

allowed to stir for an hour prior to said final dialysis. The product is obtained pure after evaporation and lyophilization of the remaining water and buffer components.

Example 15. Preparation of iodine-131-[indium-DTPA]-poly(Glu.Tyr) [4:1]

The indium-DTPA-poly(Glu.Tyr) [4:1] intermediate from example 18 is added  
 5 to an Iodogen™ vial along with 0.3 M phosphate buffer, pH 6.0, and 200 mCi of  
 iodine-131 radionuclide. The reaction is shaken for 15 minutes at room temperature,  
 and the radioiodinated indium-DTPA-poly(Glu.Tyr) [4:1] transferred out of the  
 Iodogen™ vial into a clean vial, where ascorbic acid is added to stop any further  
 oxidative reaction. Unreacted iodine-131 is removed, if required, though an anion-  
 10 exchange cartridge. The product, iodine-131-[indium-DTPA]-poly(Glu.Tyr) [4:1] is  
 then ready for use.

Example 16. Targeting Using a BisAb and iodine-131-[indium-DTPA]-poly(Glu.Tyr) [4:1]

A patient presenting with a tumor that expresses the antigen termed epithelial  
 15 glycoprotein (EGP) is treated with 200 mg of the bisAb RS7 x 734 F(ab')<sub>2</sub> x Fab'  
 [anti EGP x anti-indium-DTPA]. Four days later, when the amount of bisAb  
 remaining in circulation has dropped below 5% ID/g, and while amounts remaining in  
 tumor deposits remain high, the patient is treated with 150 mCi of iodine-131-  
 [indium-DTPA]-poly(Glu.Tyr) [4:1], prepared as described in example 19, above.  
 20 Recognition of the indium-DTPA moieties on the iodine-131-[indium-DTPA]-  
 poly(Glu.Tyr) [4:1] by the RS7 x 734 bisAb pretargeted via tumor antigen enables the  
 specific delivery of the therapeutic radionuclide iodine-131 to sites of tumor.

25

WO 03/011342

PCT/GB02/03494

Additional references of interest include the following:

- Barnias, A., and Epenetos, A.A. Two-step strategies for the diagnosis and treatment of cancer with bioconjugates. *Antibody, Immunoconjugates, Radiopharm.* 1992; 5: 385-395.
- 5 Barbet, J., Peltier, P., Bardet, S., Vuillez, JP., Bachelot, I., Denet, S., Olivier, P., Lecia, F., Corcuff, B., Huglo, D., Proye, C., Rouvier, E., Meyer, P., Chatal, J.F. Radioimmuno-detection of medullary thyroid carcinoma using indium-111 bivalent hapten and anti-CEA x anti-DTPA-indium bispecific antibody. *J.Nucl.Med.* 1998; 39:1172-1178.
- 10 Bos, ES., Kuijpers, WHA., Meesters-Winters, M., Pham, DT., deHaan, AS., van Doormalen, Am., Kaspersen, F.M., van Boeckel, CAA and Gougeon-Bertrand, F. In vitro evaluation of DNA-DNA hybridization as a two-step approach in radioimmunotherapy of cancer. *Cancer Res.* 1994; 54:3479-3486.
- Gautherot, E., Bouhou, J., LeDoussal, J-M., Manetti, C., Martin, M., Rouvier, E.,
- 15 Barbet, J. Therapy for colon carcinoma xenografts with bi-specific antibody-targeted, iodine-131-labeled bivalent hapten. *Cancer suppl.* 1997; 80: 2618-2623.
- Gautherot, E., Bouhou, J., Loucif, E., Manetti, C., Martin, M., LeDoussal, J.M., Rouvier, E., Barbet, J. Radioimmunotherapy of LS174T colon carcinoma in nude mice using an iodine-131-labeled bivalent hapten combined with an anti-CEA x anti-
- 20 indium-DTPA bi-specific antibody. *J.Nucl. Med. Suppl.* 1997; 38: 7p.
- Goodwin, D.A., Meares, CF., McCall, MJ., McTigue, M., Chaovapong, W. Pre-targeted immunoscintigraphy of murine tumors with indium-111-labeled bifunctional haptens. *J.Nucl.Med.* 1988; 29:226-234.
- Greenwood, F.C. and Hunter, W.M. The preparation of I-131 labeled human growth
- 25 hormone of high specific radioactivity. *Biochem.* 1963; 89:114-123.
- Hawkins, G.A., McCabe, R.P., Kim, C-H., Subramanian, R., Bredchorst, R., McCullers, G.A., Vogel, C.-W., Hanna, M.G.Jr., and Pomata, N. Delivery of radionuclides to pretargeted monoclonal antibodies using dihydrofolate reductase and methotrexate in an affinity system. *Cancer Res.* 1993; 53: 2368-2373.
- 30 Kranenborg, M.h., Boerman, O.C., Oosterwijk-Wakka, J., weijert, M., Corstens, F., Oosterwijk, E. Development and characterization of anti-renal cell carcinoma x

WO 03/011342

PCT/GB02/03494

- antichelate bi-specific monoclonal antibodies for two-phase targeting of renal cell carcinoma. *Cancer Res. (suppl)* 1995; 55: 5864s-5867s
- Penefsky, H.S. A centrifuged column procedure for the measurement of ligand binding by beef heart F1. Part G. *Methods Enzymol.* 1979; 56:527-530.
- 5 Schuhmacher, J., Klivenyi, G., Matys, R., Stadler, M., Regiert, T., Hauser, H., Doll, J., Maier-Borst, W., Zoller, M. Multistep tumor targeting in nude mice using bi-specific antibodies and a gallium chelate suitable for immunocintigraphy with positron emission tomography. *Cancer Res.* 1995; 55, 115-123.
- Sharkey, R.M., Karacay, Griffiths, G.L., Behr, T.M., Blumenthal, R.D.,
- 10 Mattes, M.J., Hansen, H.J., Goldenberg. Development of a streptavidin-anti-carcinoembryonic antigen antibody, radiolabeled biotin pretargeting method for radioimmunotherapy of colorectal cancer. Studies in a human colon cancer xenograft model. *Bioconjugate Chem* 1997; 8:595-604.
- Stickney, D.R., Anderson, L.D., Slater, J.B., Ahlem, C.N., Kirk, G.A., Schweighardt, S.A
- 15 and Frincke, J.M. Bifunctional antibody: a binary radiopharmaceutical delivery system for imaging colorectal carcinoma. *Cancer Res.* 1991; 51: 6650-6655.

WO 03/011342

PCT/GB02/03494

## WHAT IS CLAIMED IS:

1. A method for targeting an agent towards a target site in a tissue, comprising
  - (a) administering to said tissue a multi-specific antibody or antibody fragment, comprising a targeting arm that binds to an antigen on said target site, and a capture arm that binds to a polymer conjugate; and
  - (b) administering to said tissue a polymer conjugate that binds to said capture arm, said polymer conjugate comprising a polymer conjugated to said agent selected from the group consisting of a therapeutic agent, a peptide, an enzyme and a labeled ligand.
2. The method of claim 1, wherein said polymer conjugate has a general formula comprising (polymer backbone)-(agent)<sub>m</sub>, where m is an integer.
3. The method of claim 1, wherein said polymer conjugate further comprises a recognition hapten conjugated to said polymer.
4. The method of claim 3, wherein said polymer conjugate has a general formula comprising (recognition hapten)<sub>n</sub>-(polymer backbone)-(agent)<sub>m</sub>, where n and m are integers.
5. The method of claim 3, wherein said recognition hapten is selected from the group consisting of: diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA), a metal complex of DTPA, 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N",N'''-tetraacetic acid (DOTA), a metal complex of DOTA, N,N'-di[2-hydroxy-5-(ethylene-3-carboxy)benzyl]ethylenediamine N,N'-diacetic acid (HBED), a metal complex of HBED, fluorescein, 2,4-dinitrophenyl- derivatives, biotin and histaminyl-succinyl-glycine.
6. The method of claim 1, wherein said multi-specific antibody or antibody fragment is radiolabeled.

WO 03/011342

PCT/GB02/03494

7. The method as in any one of claims 1-7, further comprising administering a clearing composition to said tissue and allowing said clearing composition to clear unbound said multi-specific antibody or antibody fragment from said tissue.
8. The method as in any one of claims 1-7, wherein said multi-specific antibody or antibody fragment is a monoclonal antibody.
9. The method as in any one of claims 1-7, wherein said multi-specific antibody or antibody fragment is chimeric humanized or human.
10. The method of claim 1, wherein said polymer is selected from the group consisting of polymers of single amino acids, co-polymers of two amino acids, co-polymers of three amino acids, co-polymers of four amino acids, polyethylene glycol (PEG), derivatives of PEG, co-polymers of PEG, N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide (HPMA), polystyrene-co-maleic acid/anhydride (SMA), polyvinyl ether maleic anhydride (DIVEMA), polyethylencimine, ethoxylated polyethylencimine, starburst dendrimers, polyvinylpyrrolidone (PVP), apometallothionein and calicheamicin.
11. The method of claim 1, wherein said therapeutic agent is selected from the group consisting of therapeutic radioisotopes, toxins, drugs, prodrugs and boron addends.
12. The method of claim 1, wherein said labeled ligand is selected from the group consisting of radioisotopes, enhancing agents for use in magnetic resonance imaging, contrasting agents, and coloring agents.

WO 03/011342

PCT/GB02/03494

13. A kit useful for targeting a target site within a tissue in a subject or tissue sample comprising,
  - (a) a multi-specific antibody or antibody fragment comprising a targeting arm that binds to an antigen within said tissue, and a capture arm that binds to a polymer conjugate; and
  - (b) a polymer conjugate that binds to said capture arm, said polymer conjugate comprising a polymer conjugated to an agent selected from the group consisting of a therapeutic agent, a peptide, an enzyme and a labeled ligand.
14. The kit of claim 13, wherein said polymer conjugate further comprises a recognition hapten.
15. The kit of claim 13, further comprising a drug or a prodrug.
16. The kit of claim 15, wherein said enzyme converts said prodrug to an active drug.
17. The kit as in any one of claims 13-16, further comprising a clearing agent capable of clearing unbound said multi-specific antibody or antibody fragment from said subject or tissue sample.
18. The kit as in claim 17, wherein said multi-specific antibody or antibody fragment is a monoclonal antibody.
19. The kit as in claim 17 wherein said multi-specific antibody or antibody fragment is chimeric humanized or human.
20. The kit as in claim 17 wherein said multi-specific antibody or antibody fragment is radiolabeled.

## 【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
13 February 2003 (13.02.2003)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 03/011342 A3

- (51) International Patent Classification: A61K 47/48, 51/10, 51/04 (81) Designated States (national): AT, AG, AI, AM, AL, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GR, GU, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (21) International Application Number: PCT/GB02/03494 (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, SK, TR), OAPI patent (BF, BI, CH, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (22) International Filing Date: 31 July 2002 (31.07.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 00/308,605 31 July 2001 (31.07.2001) US
- (71) Applicant: IMMUNOMEDICS, INC., 100 American Road, Morris Plains, NJ 07960 (US)
- (72) Inventor: GHIFPITHS, Gary, L.; 36 Ladgell Avenue, Mount Pleasant, NJ 07960 (US)
- (74) Agent: W.P. THOMPSON & CO., Coopers Building, Church Street, Liverpool L1 3AB (GB)
- Published:  
with international search report
- (88) Date of publication of the international search report: 16 October 2003
- For two letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 03/011342 A3

(54) Title: TARGETED POLYMERIC DELIVERY SYSTEM

(57) Abstract: The present invention relates to a method for targeting an agent towards a target site in a tissue comprising (a) administering to a tissue a multi-specific antibody (mAb) or multi-specific antibody fragment, comprising a targeting arm that binds to an antigen on the target site, and a capture arm that binds to a polymer conjugate; and (b) administering to the tissue a polymer conjugate that binds to the capture arm, with the polymer conjugate comprising a polymer conjugated to an agent selected from the group consisting of a therapeutic agent, a peptide, an enzyme and a labeled ligand. The present invention also relates to a kit, useful for targeting a target site in a tissue or tissue sample, comprising, (a) a multi-specific antibody or antibody fragment comprising a targeting arm that binds to an antigen on said target site, and a capture arm that binds to a polymer conjugate or hapten-polymer conjugate; and (b) a polymer conjugate that binds to the capture arm, with the polymer conjugate comprising a polymer conjugated to an agent selected from the group consisting of a therapeutic agent, a peptide, an enzyme and a labeled ligand.



## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Int. Application No. PCT/GB 02/03494
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K47/48 A61K51/10 A61K51/04		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the steps searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, PAJ, WPI Data, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS <sup>1</sup>		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim no.
X	WO 99 66951 A (MCBRIDE WILLIAM J ;HANSEN HANS J (US); LEUNG SHUI ON (US); GU ZHEN) 29 December 1999 (1999-12-29)	1-20
Y	the whole document --- -/-	1,5, 10-12
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of our C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the prior art of another claim or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed **T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to demonstrate the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone **Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered as involving an inventive step when the document is combined with one or more other such documents; such combination being obvious to a person skilled in the art. *A* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 22 May 2003		Date of mailing of the international search report 17.06.2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5010, Patentstr. 2 NL - 2000 HV Rijswijk Tel: (+31)-70 340-2040, Tx: 31 851 400 00 Fax: (+31)-70 340-3016		Authorized officer Vadot, P

Form PCT/ISA/210 (second sheet) July 2002

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		at Application No PCT/GB 02/03494
C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevance to claims No.
X	HOES C J T ET AL: "SYNTHESIS AND STODISTRIBUTION OF IMMUNOCONJUGATES OF A HUMAN IGM AND POLYHERIC DRUG CARRIERS" JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V. AMSTERDAM, NL, vol. 19, no. 1 / 3, 1 March 1992 (1992-03-01), pages 59-76, XP000261545 ISSN: 0168-3659 page 60, LH column, paragraph 2 page 60, RH column, paragraph 1 page 70, paragraph "discussion": paragraph 1 and 2 abstract ---	1, 2, 6, 8, 10, 11
X	EP 0 419 387 A (IMMUNOTECH PARTNERS) 27 March 1991 (1991-03-27)	1-11, 13-20
Y	claims 1-16 ---	5
X	WO 99 30745 A (GOVINDAN SERENGULAM V ;HANSEN HANS (US); GRIFFITHS GARY L (US); IM) 24 June 1999 (1999-06-24) the whole document ---	1, 3, 5, 7, 10, 11
X	VUILLEZ J PH ET AL: "TWO-STEP IMMUNOSCINTIGRAPHY FOR NON-SMALL-CELL LUNG CANCER STAGING USING A BISPECIFIC ANTI-CEA/ANTI-INDIUM-DTPA ANTIBODY AND AN INDIUM-111-LABELED DTPA DIMER" JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE, SOCIETY OF NUCLEAR MEDICINE, NEW YORK, US, vol. 38, no. 4, 1997, pages 507-511, XP002911777 ISSN: 0161-5505 Abstract page 510, rh column, lines 12-14 page 507, left-hand column, line 16 -page 507, right-hand column, line 1-3	1-8
A	GOODWIN DA, MEARES CF: "Pretargeting" AMERICAN CANCER SOCIETY, vol. 80, no. 12, 1997, pages 2675-2680, XP002230984 Sixth conference on Radioimaging and Radioimmunotherapy, Princeton, NJ the whole document ---	1
A	GOODWIN D A: "Tumor Pretargeting: Almost the Bottom Line" JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE, SOCIETY OF NUCLEAR MEDICINE, NEW YORK, US, vol. 36, no. 5, May 1995 (1995-05), pages 876-879, XP002100565 ISSN: 0161-5505 the whole document ---	1
-/-		

Form PCT/GB 02/03494 (continued from page 1) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Inventor Application No PCT/GB 02/03494
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TST WANG, FAWWAZ RA, PO ALDERSON: "Reduced hepatic accumulation of radiolabeled monoclonal antibodies with indium -111-thioether-Poly-L-Lysine-OTPA-monoclon al antibody-TP41.2F(ab') <sub>2</sub> " THE JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE, vol. 33, no. 4, 1992, pages 570-574, XP001109643 Abstract	1-20
X	LE DOUSSAL JM, GRUAZ-GUYON A, MARTIN, H, GAUTHEROT E, DELAAGE M, BARBET J: "Targeting of Indium 111-labeled bivalent hapten to human melanoma mediated by bispecific monoclonal antibody conjugates : imaging of tumors hosted in Nude mice" CANCER RESEARCH, vol. 50, 1990, pages 3445-3452, XP008013744 the whole document	12
X	KARACAY H, MCBRIDE WJ, GRIFFITHS GL, SHARKEY RM, BARBET J, HANSEN HJ, GOLDENBERG DM: "Experimental pretargeting studies of cancer with a humanized anti-CEA * Murine anti-(In-OTPA) bispecific antibody construct and a 99mTc/188Re-labeled Peptide" BIOCONJUGATE CHEMISTRY, vol. 11, pages 842-854, XP002230983 the whole document	1-7, 9-11,13, 14,17, 19,20
Y	WO 93 12819 A (RHOMED INC) 8 July 1993 (1993-07-08) page 2, line 2	10
Y	EP 1 046 394 A (IMARX PHARMACEUTICAL CORP) 25 October 2000 (2000-10-25) page 37, line 47,48	11
	--- -/-	

Form PCT/ISA/210 (continuation of applicant's sheet) (July 1993)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/GB 02/03494
C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	VUILLEZ J-P ET AL: "RADIOIMMUNOTHERAPY OF SMALL CELL LUNG CARCINOMA WITH THE TWO-STEP METHOD USING A BISPECIFIC ANTI-CARCINOEMBRYONIC ANTIGEN/ANTI-DIETHYLENETRIAMINEPENTAACETIC ACID (DTPA) ANTIBODY AND IODINE-131 DI-DTPA HAPTEN: RESULTS OF A PHASE I/II TRIAL" CLINICAL CANCER RESEARCH, THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 5, no. 10, SUPPL, October 1999 (1999-10), pages 3259S-3267S, XP001109647 ISSN: 1078-0432 abstract	12
Y	DUNCAN J R ET AL: "INDIUM-111-DIETHYLENETRIAMINEPENTAACETIC ACID-OCTREOTIDE IS DELIVERED IN VIVO TO PANCREATIC, TUMOR CELL, RENAL, AND HEPATOCYTE LYOSOMES" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, vol. 57, no. 4, 15 February 1997 (1997-02-15), pages 659-671, XP001109646 ISSN: 0008-5472 abstract	1
Y	GUPTA H ET AL: "INFLAMMATION: IMAGING WITH METHOXY POLY(ETHYLENE GLYCOL)-POLY-L-LYSINE-DTPA, A LONG-CIRCULATING GRAFT COPOLYMER" RADIOLOGY, OAK BROOK, IL, US, vol. 197, no. 3, 1 December 1995 (1995-12-01), pages 665-669, XP002037429 ISSN: 0033-8419 see paragraph material and methods	12
A	EP 0 650 735 A (AKZO NOBEL NV) 3 May 1995 (1995-05-03) the whole document	1-20

Form: PCT/GBA/210 (continuation of drawing sheet) July 1992

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>	International application No. PCT/08 02/03494
<b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)</b>	
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. <input type="checkbox"/> <b>Claims Nos.:</b> because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:	
2. <input type="checkbox"/> <b>Claims Nos.:</b> because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:	
3. <input type="checkbox"/> <b>Claims Nos.:</b> because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
<b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)</b>	
This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:	
see additional sheet	
1. <input checked="" type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.	
2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:	
Remark on Protest	<input type="checkbox"/> This additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input checked="" type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/SA 02 23494

## FURTHER INFORMATION CONTAINED FROM PCTISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

## 1. Claims: 1-11, 13-20

A method for targeting an agent conjugated to a polymer towards a target site in a tissue, comprising a pretargeting step with a multispecific antibody. The agent can be selected from the group consisting of :  
a therapeutic agent.

## 2. Claims: 1-11, 13-20

A method for targeting an agent conjugated to a polymer towards a target site in a tissue, comprising a pretargeting step with a multispecific antibody. The agent can be selected from the group consisting of :  
a peptide.

## 3. Claims: 1-11, 13-20

A method for targeting an agent conjugated to a polymer towards a target site in a tissue, comprising a pretargeting step with a multispecific antibody. The agent can be selected from the group consisting of :  
an enzyme.

## 4. Claims: 1-20

A method for targeting an agent conjugated to a polymer towards a target site in a tissue, comprising a pretargeting step with a multispecific antibody. The agent can be selected from the group consisting of :  
a labeled ligand.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				Inventor's Application No. PCT/GB 02/03494	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
WO 9966951 A	29-12-1999	AU 4579299 A	10-01-2000		
		CA 2335364 A1	29-12-1999		
		EP 1089766 A2	11-04-2001		
		JP 2002518460 T	25-06-2002		
		WO 9966951 A2	29-12-1999		
		US 6228362 B1	08-05-2001		
		US 2002006379 A1	17-01-2002		
EP 0419387 A	27-03-1991	FR 2652004 A1	22-03-1991		
		AT 145338 T	15-12-1996		
		AU 638488 B2	01-07-1993		
		AU 6303490 A	28-03-1991		
		CA 2025607 A1	22-03-1991		
		DE 69029184 D1	02-01-1997		
		DE 69029184 T2	05-06-1997		
		DK 419387 T3	07-04-1997		
		EP 0419387 A1	27-03-1991		
		ES 2094750 T3	01-02-1997		
		JP 2914737 B2	05-07-1999		
		JP 3173900 A	29-07-1991		
		KR 166075 B1	15-01-1999		
		US 5274076 A	28-12-1993		
WO 9930745 A	24-06-1999	US 6120768 A	19-09-2000		
		AU 1825899 A	05-07-1999		
		WO 9930745 A2	24-06-1999		
WO 9312819 A	08-07-1993	US 5346687 A	13-09-1994		
		US 5460785 A	24-10-1995		
		US 5443816 A	22-08-1995		
		US 5738838 A	14-04-1998		
		US 5556609 A	17-09-1996		
		AT 197767 T	15-12-2000		
		AU 683833 B2	27-11-1997		
		AU 3427293 A	28-07-1993		
		CA 2127284 C	05-02-2002		
		DE 69231586 D1	04-01-2001		
		DE 69231586 T2	19-07-2001		
		DK 629133 T3	02-04-2001		
		EP 0629133 A1	21-12-1994		
		ES 2155447 T3	16-05-2001		
		WO 9312819 A1	08-07-1993		
		US 5861139 A	19-01-1999		
		US 5700444 A	23-12-1997		
		US 5759515 A	02-06-1998		
		US 5759516 A	02-06-1998		
		US 5690905 A	25-11-1997		
		US 5718882 A	17-02-1998		
		US 5567408 A	22-10-1996		
		US 5670133 A	23-09-1997		
		US 5985240 A	16-11-1999		
EP 1046394 A	25-10-2000	EP 1046394 A2	25-10-2000		
EP 0650735 A	03-05-1995	EP 0650735 A2	03-05-1995		
		AU 678474 B2	29-05-1997		
		AU 6736094 A	19-01-1995		
		CA 2126819 A1	10-01-1995		

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1999)

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0650735	A		FI 943269 A	10-01-1995
			JP 7181186 A	21-07-1995
			ZA 9404893 A	20-02-1995

Form PCT/ISA210 (page 2 of 2) (July 1992)



フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K 49/02

A

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES, FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 グリフィス, ゲイリー・エル

アメリカ合衆国ニュージャージー州 0 7 9 6 0, モリスタウン, エッジヒル・アヴェニュー 3 6

Fターム(参考) 4C076 AA95 CC27 CC41 EE03 EE06 EE13 EE15 EE16 EE23 EE41

EE48 EE59

4C085 AA13 AA14 AA21 AA24 AA26 BB24 HH03 HH07 KA09 KA28

KA29 KB10 KB18 KB70 KB76 KB82 LL18